

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Neuhaus)

Untersuchungen zur Effizienz einer CTLA-4Ig Therapie in Kombination mit
adoptivem Zelltransfer zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen im Modell
der orthotopen Rattenlebertransplantation

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Chirurgie

an der

Charité, Campus Virchow-Klinikum
der Humboldt Universität zu Berlin

vorgelegt von:

Dr. med. Ulf Peter Neumann

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B. Kremer
2. Prof. Dr. med. A. Thiede

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 25.03.2003

Inhaltsverzeichnis:

I.	Einleitung:	5
A.	Lebertransplantation	5
B.	Pathophysiologische Mechanismen der Transplantatabstoßung	9
C.	Transplantationsimmunologie im Rattenmodell.....	13
D.	Chimärismus und adoptiver Zelltransfer	15
E.	Bedeutung co-stimulatorischer Signale für die Transplantationsmedizin	17
II.	Fragestellung:	24
III.	Material und Methoden:	25
A.	Tierwahl und Tierhaltung	25
B.	Behandlung mit CTLA-4Ig und Milzzellen.....	25
B.1	Separation von Milzzellen.....	25
C.	Experimenteller Plan.....	26
C.1	Vorversuch	27
C.2	Hauptversuch.....	27
D.	Technik der Lebertransplantation	31
D.1	Anästhesie und Operationsvorbereitung	31
D.2	Spenderoperation und Hepatektomie	31
D.3	Empfängeroperation	34
E.	Histologische und molekularbiologische Untersuchungen.....	37
E.1	Probengewinnung.....	37
E.2	Isolierung von RNA und Protein.....	37
E.2.1	Materialien	37
E.2.2	Durchführung (Blumberg 1987)	41
E.2.3	Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Gelelektrophorese ...	41
E.2.4	Reverse Transkription und DNase-Verdau.....	42
E.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
E.3.1	Oligonukleotide (Primer).....	43
E.3.2	Durchführung der PCR	44
E.4	Proteinchemische Methoden	45
E.4.1	Proteinkonzentrationsbestimmung in Probenhomogenaten.....	45

E.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
E.4.3	Western-blot-Analyse	46
E.5	Histologische Techniken	47
E.5.1	Hämatoxilin-Eosin (H.E.)-Färbungen	47
E.5.2	Immunhistochemische Untersuchungen (APAAP-Methode)	48
E.5.3	In-situ-Apoptose-Detektion	49
F.	Statistik	49
IV.	Ergebnisse:.....	50
A.	Klinischer Verlauf nach orthotoper Rattenlebertransplantation	50
B.	Überleben und histologische Befunde	50
B.1	Vorversuch	50
B.2	Hauptversuch.....	51
B.2.1	Präkonditionierung der ORLT Empfänger (Hauptgruppe 1).....	51
B.2.2	Hauptgruppe 2.....	56
B.2.3	Behandlung ab Tag 3 nach ORLT (Hauptgruppe 3).....	60
C.	Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen	64
C.1	Zytokin-Bestimmungen.....	64
C.1.1	Interleukin-2.....	64
C.1.2	Interleukin-4 mRNA-Transskripte im Lebergewebe	70
C.1.3	Interleukin-10 mRNA-Transskripte im Lebergewebe	72
C.1.4	Interleukin-12 β 2 mRNA-Transskripte im Lebergewebe.....	74
C.1.5	Interferon- γ mRNA-Transskripte im Lebergewebe.....	76
C.2	Chimärismus.....	78
C.2.1	Immunhistochemie anti-rat RT1A ^{a,b}	78
C.3	Apoptose-Nachweise.....	80
C.3.1	PARP-Western Blot.....	80
C.3.2	In-situ-Apoptose-Detektion	82
V.	Beantwortung der Fragen:.....	85
VI.	Diskussion:.....	87
A.	Toleranzinduktion nach experimenteller Organtransplantation.....	87
A.1	Lokalisation und Mechanismen der Toleranz	87

A.2	Methoden und klinische Entwicklung der Toleranzinduktion	90
B.	Toleranzinduktion nach Lebertransplantation	92
B.1	Sonderrolle der Leber in der Transplantationsimmunologie.....	92
B.2	Physiologische Ursachen des immunologischen Sonderstatus der Leber.....	93
B.3	Toleranz nach orthotoper Rattenlebertransplantation	94
C.	Effizienz einer CTLA-4Ig-Behandlung und adoptivem Zelltransfer nach ORLT.....	98
VII.	Zusammenfassung:	107
VIII.	Literatur:	110
IX.	Anhang	130
A.	Abkürzungen.....	130
X.	Danksagung	131

I. Einleitung:

A. Lebertransplantation

Die erste erfolgreiche humane orthotope Lebertransplantation wurde 1963 von Thomas E. Starzl in Denver, USA, durchgeführt (Starzl, Marchioro et al. 1963; Starzl, Marchioro et al. 1964; Starzl, Groth et al. 1968). Im Jahr 1967 gelang Starzl in Denver die erste Lebertransplantation, die der Patient mehr als ein Jahr überlebte und erst später an dem Rezidiv eines malignen Tumors verstarb (Starzl, Groth et al. 1968; Calne 1977; Starzl 1989). In den folgenden Jahren war die Lebertransplantation aufgrund technischer Probleme, immunologischer Komplikationen und mangelhafter Konservierung der Transplantate mit einer hohen Letalität behaftet (Shaw, Martin et al. 1984; Lerut, Gordon et al. 1987; Lerut, Gordon et al. 1987; Starzl and Demetris 1990). Erst Fortschritte in diesen Bereichen der Transplantationsmedizin ebneten den Weg für die klinische Lebertransplantation.

Eine Konsensus-Konferenz über den Stellenwert der klinischen Lebertransplantation folgte im Jahr 1983 in den USA (Natl-Inst-Health-Consens-Dev-Conf 1983). Die Ergebnisse der letzten Jahre ließ die Teilnehmer dieser Konferenz zu dem Schluß kommen, daß die orthotope Lebertransplantation (OLT) beim Menschen nicht länger ein klinischer Versuch, sondern ein etabliertes Verfahren bei terminal leberinsuffizienten Patienten ist.

Trotz der vorangegangenen Erfolge waren zu diesem Zeitpunkt wesentliche Probleme der Transplantationsmedizin verbessert, aber nicht gelöst. Insbesondere immunologische Phänomene wie akute und chronische Abstoßungsepisoden reduzierten die Langzeitprognose von Empfängern eines allogenen Transplantates (Demetris, Adams et al. 1996; Wiesner, Batts et al. 1999).

Unter einer Abstoßungsreaktion versteht man die Immunantwort des Transplantatempfängers auf das Transplantat, welche unbehandelt sicher zum Transplantatverlust führt. Erste Schritte zur Unterdrückung dieser Immunantwort unternahmen Schwartz et al. (Schwartz, Stack et al. 1959) in den Arbeiten über den Anti-Metaboliten 6-Mercaptopurin. Aus dessen Weiterentwicklung ging Azathioprin hervor, das Calne 1960 erfolgreich in der Nierentransplantation bei Hunden erprobte (Calne 1960). Der Erfolg der Tierexperimente konnte bei der humanen Nierentransplantation nicht wiederholt werden. Eine optimierte Immunsuppression wurde erst durch Starzl 1963 erreicht, der Azathioprin mit Kortikosteroiden kombinierte (Starzl, Marchioro et al. 1963; Briggs 1991).

Mit der Einführung von Cyclosporin A gelang dann 1981 der wesentliche Fortschritt in der immunsuppressiven Therapie, der die Frequenz der immunologisch bedingten Transplantatverluste dramatisch reduzierte (Borel, Feurer et al. 1976; Calne, Rolles et al. 1979; Starzl, Iwatsuki et al. 1986; Neuhaus, Blumhardt et al. 1995).

Seit Ende der achtziger Jahre stehen mit Tacrolimus, MMF, Sirolimus und spezifischen Antikörpertherapien (anti-IL-2-Rezeptor, anti-CD3-Antikörper) eine Vielzahl weiterer Immunsuppressiva zur Verfügung (Anonymous 1994; Anonymous 1994; Langrehr, Glanemann et al. 1998; Chang, Mahanty et al. 2000; Sterneck, Fischer et al. 2000).

Dies führte in den letzten Jahren zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens nach solider Organtransplantation. Heute werden von der UNOS Registry 5-Jahresüberlebensraten nach Nieren-, Herz- und Lebertransplantation von 81,8%, 69,8% und 74,2% (UNOS 1999) angegeben. Im eigenen Zentrum werden nach Lebertransplantation 5-, und 10-Jahresüberlebensraten von 83,6% bzw. 75,7% erreicht (*Abbildung 1*).

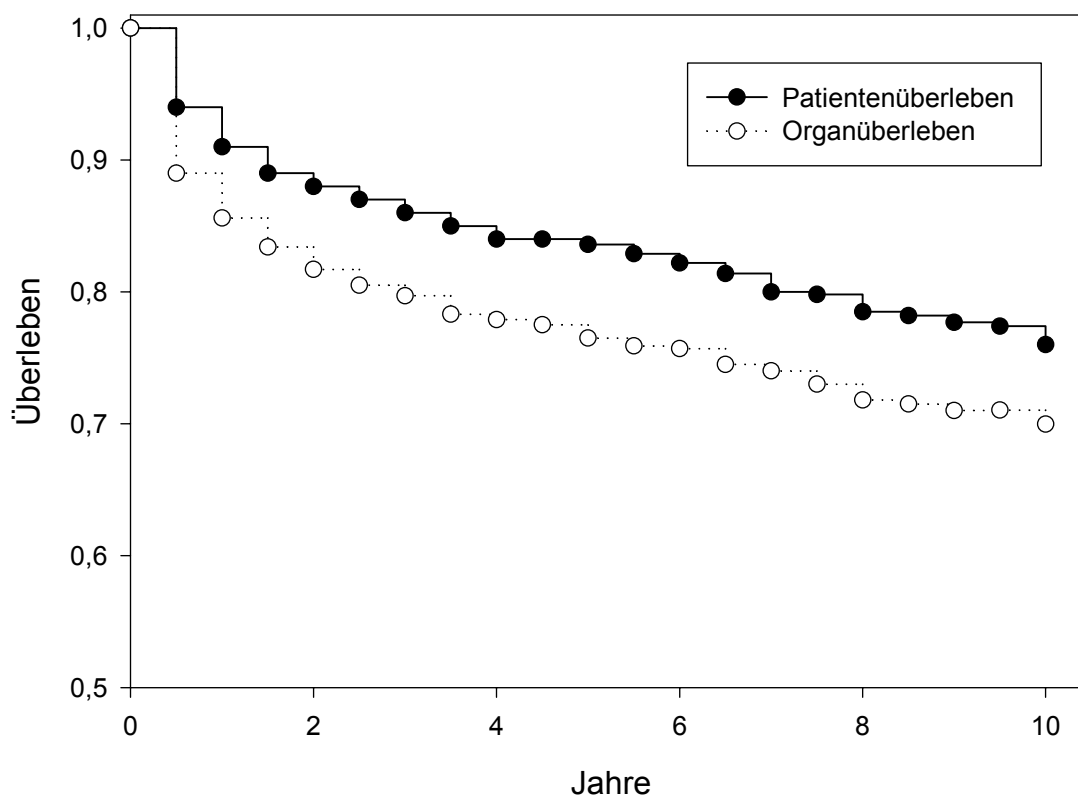


Abbildung 1: Langzeitüberlebensraten lebertransplantierter Patienten und Organe seit September 1988 in Berlin.

Auf der einen Seite zeigt die aktuelle Analyse der Langzeitverläufe nach Lebertransplantation, daß durch die effektivere Immunsuppression immunologische Transplantverluste in der akuten Phase nach Transplantation selten geworden sind. Auf der anderen Seite sind die Nebenwirkungen der Immunsuppressiva gerade im Langzeitverlauf nach der Transplantation zu einem dominierenden Problem geworden. Durch die immunsuppressive Therapie hervorgerufene Nebenwirkungen wie Hypertonus, Hyperlipidämien, Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus und die gehäufte Inzidenz von Malignomen verschlechtern signifikant die Lebensqualität und Überlebensraten transplantierte Patienten (Graziadei, Wiesner et al. 1999; Sheiner, Magliocca et al. 2000) (Abbildung 2).

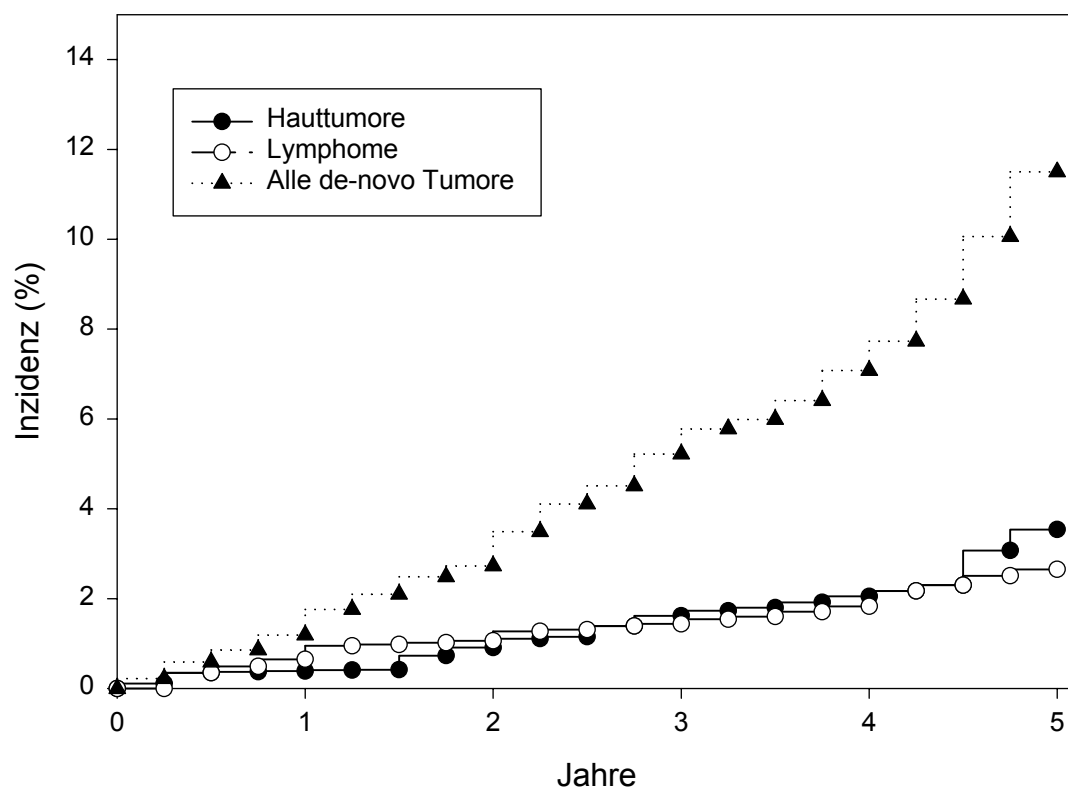


Abbildung 2: Inzidenz maligner Erkrankungen nach Lebertransplantation in Berlin.

Daher ist es Ziel der Toleranzforschung, ein Langzeitüberleben transplantierten Patienten ohne eine kontinuierliche immunsuppressive Therapie zu ermöglichen. Toleranz stellt den Zustand einer antigen-spezifischen Nichtreaktivität dar, die durch vorherige Exposition des toleranten Organismus gegen das betreffende Antigen (Tolerogen), z.B. im unreifen Organismus oder durch medikamentöse Therapie, induziert wird. Toleranz ist damit das Gegenteil von Immunität mit konsekutiver Abstoßung des betreffenden transplantierten Organs. Die Toleranz gegen definierte Alloantigene kann bei B- und T-Lymphozyten ausgeprägt sein. Die Bemühungen, Toleranz nach Organtransplantation zu erzielen, wurden in den letzten Jahren aufgrund der weiterhin relevanten Inzidenz immunologisch bedingter Transplantatverluste, sowie den Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapien intensiviert.

B. Pathophysiologische Mechanismen der Transplantatabstoßung

Die akute Abstoßung von Leberallotransplantaten (allogen: Transplantation von Organen zwei genetisch verschiedener Individuen gleicher Spezies) wird durch die Interaktion verschiedener Zellen wie zytotoxischer T-Zellen, T-Helferzellen, antikörperbildender B-Zellen, Makrophagen und „natürlicher Killer-Zellen“ (NK-Zellen) bewirkt (Bolton, Gracie et al. 1989). Die entscheidende Voraussetzung zur Transplantatabstoßung ergibt sich aus dem Erkennungsmechanismus von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“. Das Immunsystem bedient sich hierfür spezifischer Zelloberflächenmoleküle, die in verschiedenen Genabschnitten auf dem Chromosom 6 im humanen Erbgut kodiert werden. Dieser als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bezeichnete Chromosomenabschnitt wurde 1958 erstmals als humaner Leukozyten-Antigen Komplex (HLA) beschrieben (Dausset 1958). Der MHC wird in einen MHC-Klasse-I, welcher auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird, und MHC-Klasse-II auf kernhaltigen Zellen des Immunsystems und aktivierten Zellen unterteilt (Rotzschke and Falk 1991; Weiss and Bogen 1991). Jedem Individuum stehen mindestens sechs verschiedene HLA-Moleküle zur Verfügung (MHC I: HLA-A, -B, -C und MHC II: HLA-DR, -DQ, -DP). Hieraus ergibt sich für das genetische System eine Vielfalt, die einerseits die biologische Identität und andererseits eine Schranke bei der Übertragung fremder Gewebeantigene darstellt.

Bei der Differenzierung von „Selbst-“ und „Nicht-Selbst-MHC-Peptid-Komplexen“ ergaben Beobachtungen an Kälberzwillingen erste Hinweise auf Ort und Zeitpunkt der Entwicklung (Owen, Davis et al. 1946). Zweieiige Kälberzwillinge, die bereits in utero durch den gemeinsamen plazentaren Blutkreislauf hämatopoetische Zellen ausgetauscht hatten, waren nach der Geburt nicht in der Lage, Geschwisterzellen abzustößeln, wie dies normalerweise der Fall ist. Auf diesen Versuchen bauten die Experimente zur „aktiv erworbenen Toleranz“ auf (Billingham, Brent et al. 1953; Billingham, Brent et al. 1956). Demnach erfolgt die Differenzierung, bevor die Reifung des Immunsystems abgeschlossen ist.

Nach Reifung des Immunsystems stellen MHC-Antigene den stärksten immunogenen Stimulus zur Aktivierung allogener T-Zellen dar (Lederberg 1959). Hierbei spielen die T-Helferzellen ($CD4^+$), welche MHC-II-restringiert sind, eine wichtige Rolle, da sie die Abwehr von B-Zellen als auch zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) gegen Fremdanigene maßgeblich steigern.

Drei Signale sind für ruhende T-Zellen notwendig, um auf ein Antigen-Stimulus reagieren zu können. Das erste Signal ist antigen-spezifisch und wird über den T-Zell Rezeptor (TCR)

vermittelt (Marrack and Kappler 1987; Davis, Boniface et al. 1998). Das zweite Signal ist antigen-unspezifisch und wird über verschiedene Ligandenpaare inklusive CD28/B7.1 (CD80); CD 28:B7.2 (CD 86); LFA-1:ICAM-1 (CD 54) und CD 40:CD 154 (gp39, CD 40L) vermittelt (Linsley, Clark et al. 1990; Schwartz 1990; Boussiotis, Freeman et al. 1993; Guinan, Gribben et al. 1994; Walunas, Lenschow et al. 1994; Sayegh, Akalin et al. 1995; Foy, Aruffo et al. 1996; Lenschow, Walunas et al. 1996). Das dritte Signal beruht auf der Aktivierung von zytotoxischen Zytokinen/Wachstumsfaktoren (Hollander, Zuklys et al. 1999) (*Abbildung 3*).

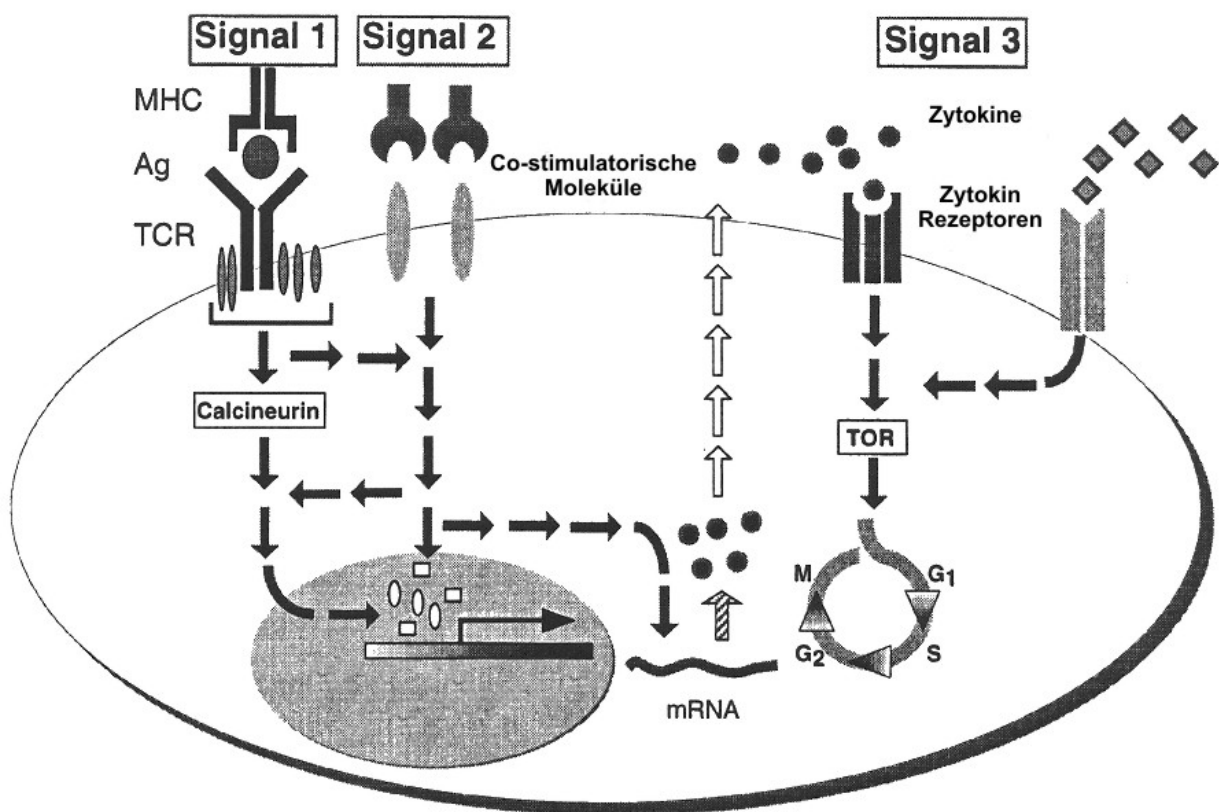


Abbildung 3: Nach Bindung an den T-Zell Rezeptor erfolgt das 2. co-stimulatorische Signal der T-Zell-Aktivierung. Hieran schließt sich das 3. Signal an, welches in der Expression verschiedener Zytokine mündet (modifiziert nach Hollander et al.) (Hollander, Zuklys et al. 1999).

Zytokine sind kleine Proteine, deren Expression und Sekretion durch die Antigen-vermittelte Lymphozytenaktivierung verstärkt wird. Sowohl zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen als auch die als T-Helfer Zellen bezeichneten $CD4^+$ T-Zellen sind durch die Freisetzung spezifischer Zytokinmuster charakterisiert. Naive Lymphozyten können sich zu $CD4^+$ T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (TH-1-Zellen) entwickeln, die eine zelluläre Immunantwort durch die Sekretion der Zytokine Interleukin-2 (IL-2), einem parakrinen Wachstums- und Differenzierungsfaktor, und Interferon- γ (INF- γ) unterstützen oder zu T-Helfer-Zellen vom Typ 2 (TH-2-Zellen) differenzieren, die eine humorale Immunantwort durch die Sekretion der Zytokine Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10) fördern (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). Dies erfolgt über eine Vorläuferzelle, die sowohl IL-2, INF- γ als auch IL-4 sezerniert (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). Die Entwicklung der T-Helfer Vorläuferzellen zu TH-1- und TH-2-Zellen läuft peripher, also nicht im Thymus ab, und ist somit unabhängig von einer zentralen intrathymalen Prägungsphase (Rocken, Saurat et al. 1992; Kamogawa, Minasi et al. 1993). Eine Übersicht über die $CD4^+$ T-Zellen Subtypen gibt *Abbildung 4*.

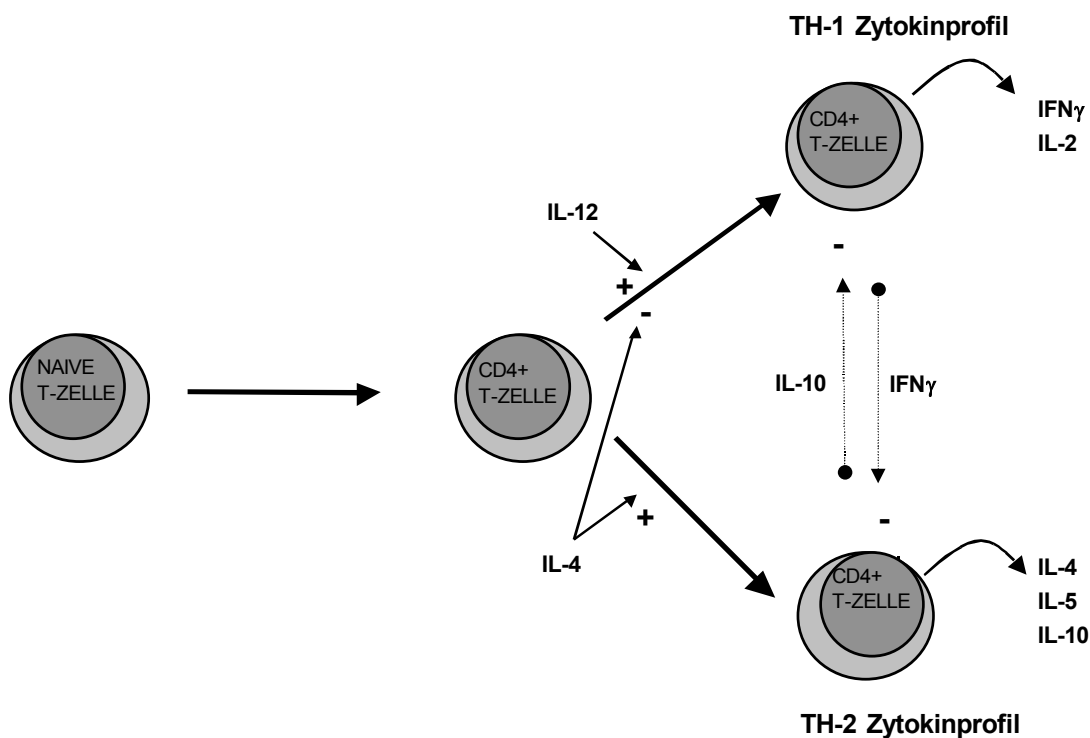


Abbildung 4: Entwicklung der naiven T-Zelle zur $CD4^+$ T-Zelle mit einem TH-1/TH-2 Zytokin-Expressionsmuster.

Neben dem unterschiedlichen Zytokin-Repertoire existieren weitere funktionelle Unterschiede der TH-1/TH-2-Subpopulationen. Die CD4⁺ T-Zellen benutzen je nach Zugehörigkeit zu einer der Untergruppen unterschiedliche Adhäsionsmoleküle, um in entzündetes Gewebe zu gelangen (Austrup, Vestweber et al. 1997). Auch die Verarbeitung stimulierender Signale von der Zelloberfläche ist abhängig von der Zugehörigkeit zu der TH-1- oder TH-2-Familie. Nach Aktivierung des TCR konnten unterschiedliche Signalkaskaden in TH-1- und TH-2-Zellklonen nachgewiesen werden (Lederer, Liou et al. 1996). Die pathophysiologische Rolle dieser Phänomene bei der Entwicklung von Abstoßungsreaktionen wurde mehrfach aufgezeigt. Eine Zuordnung der Immunantwort zu einer TH-1-oder TH-2-Effektorzellantwort als diagnostische Möglichkeit zur Charakterisierung der Abstoßung versus Transplantatakzeptanz konnte bis jetzt nicht eindeutig aufgezeigt werden. Es hat sich vielmehr gezeigt, daß das Zytokinprofil im Verlauf einer Abstoßung nur schwierig zuzuordnen ist. Eine Vielzahl tierexperimenteller Versuche konnten zeigen, daß eine verminderte TH-1-Antwort ein möglicher Bestandteil bei der Toleranzinduktion ist (Burdick and Clow 1990; Dallman, Shiho et al. 1991; Bugeon, Cuturi et al. 1992; Dallman 1995). Andere Arbeiten zeigten eine gleichzeitige Hochregulierung der TH-2-Antwort im Rahmen der Toleranzentwicklung (Takeuchi, Lowry et al. 1992; Siegling, Lehmann et al. 1994).

Im Rahmen der Lebertransplantatabstoßung sezernieren aktivierte T-Zellen unter anderem IL-2. Dies induziert die Proliferation, Differenzierung, Rekrutierung von T-Zellen und Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen (Halloran, Broski et al. 1993). Diese IL-2 stimulierten T-Zellen setzen ihrerseits wiederum TH-2-Zytokine wie IL-4 und IL-5 frei, wodurch B-Zellen in die Lage versetzt werden, spezifische Antikörper gegen das Transplantat zu bilden. IL-2 führt weiterhin zur Reifung zytotoxischer T-Zellen, zur Freisetzung von Interferon- γ und Makrophagenaktivierung. Diese immunologische Kaskade endet in einer starken entzündlichen Reaktion, wobei weitere Zytokine zu einer vermehrten Expression von MHC-Antigenen und Adhäsionsmolekülen des Transplantates führen, die wiederum zu einer Attraktion anderer Effektorzellen Anlaß geben. Die Zerstörung des Lebertransplantates wird durch direkte Zytotoxizität gegen MHC-Produkte auf Transplantatzellen und einer allgemeinen Entzündungsreaktion mit Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Leukozyten abgeschlossen.

C. Transplantationsimmunologie im Rattenmodell

Transplantate können *syngen* zwischen genetisch identischen Individuen innerhalb eines Inzuchtstammes oder *allogen* zwischen genetisch disparaten Individuen innerhalb derselben Spezies übertragen werden. Bei syngen Transplantationen sind immunologisch bedingte Reaktionen des Transplantates ausgeschlossen. In diesen Modellen lassen sich technische Einflüsse auf das Transplantat wie Operationstrauma oder Organkonservierung analysieren. Durch allogene Transplantation ist die Analyse immunologischer Phänomene wie Rejektion, Toleranzentwicklung und Erprobung immunsuppressiver Protokolle möglich. Die Stärke der Abstoßung hängt von der Antigenität des Spenderstammes und der immunologischen Reaktionslage des Empfängerstammes ab, die genetisch determiniert ist. Durch die Auswahl einer geeigneten Spender-Empfänger-Kombination ist die Abstoßungsstärke und die Überlebensrate somit gezielt wählbar (Zimmermann, Davies et al. 1984).

Die Antigenität des Transplantates wird durch Histokompatibilitätsantigene determiniert, die im MHC-Komplex der Ratte auf dem Chromosom 14 kodiert werden, das homolog zu dem der Maus und des Menschen ist und als RT1 bezeichnet wird. Es werden mindestens sechs Klasse I-Loci (RT1.A, Pa, F,E,G,C) und drei Klasse II-Loci (RT1.B, RT1.D, RT1.H) bei Ratten unterschieden (Hedrich 1991; Gunther 1996). Klasse I-Antigene werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und stimulieren die zelluläre und humorale Immunantwort. Zellen mit Klasse I-Antigenen stellen das primäre Ziel für CD8⁺ zytotoxische T-Zellen bei der Abstoßung von Haut- und primär vaskularisierten Allotransplantaten dar. Klasse II-Antigene sind auf Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, Endothelzellen und proximalen Tubuluszellen nachweisbar. Sie stimulieren hauptsächlich die CD4⁺ proliferative T-Zellantwort gegen ein Alloantigen.

Die Variationen in der von der Abstoßungsstärke abhängigen Überlebensrate nach Lebertransplantation in verschiedenen Spender-Empfänger-Kombinationen sind neben der Antigenität des Transplantates durch Unterschiede in der immunologischen Reaktionslage erklärbar. Dabei werden sog. "low responder"-Stämme mit schwacher Reaktion von sog. "high responder"-Stämmen mit starker Abstoßungsreaktion unterschieden (Zimmermann, Davies et al. 1984) (*Tabelle 1*). Immunregulatorische Gene, die mit dem MHC assoziiert sind, und weitere als non-MHC bezeichnete Hintergrundgene scheinen eine wichtige Rolle bei der Rejektion zu spielen (Butcher, Corvalan et al. 1982). Der standardisierte Ablauf der immunologischen Antwort eines Rattenempfängers auf ein allogenes Lebertransplantat und

die sichere technische Wiederholbarkeit im Gegensatz zum Mausmodell macht es zum idealen Modell zur Untersuchung immunologischer Phänomene nach Organtransplantationen.

Tabelle 1: Überleben von allogenen lebertransplantierten Ratten in Abhängigkeit von der Abstoßungsstärke in den verschiedenen Stammkombinationen (RT1 und nicht-RT1 inkompatibel) (Zimmermann, Davies et al. 1984).

Reaktivität	Spender-Stamm	Empfänger-Stamm	Ratten (n)	Mittleres Überleben (Tage)
High Responder	AUG (RT1 ^c)	Lew (RT1 ^l)	5	18,2
	PVG (RT1 ^c)	Lew (RT1 ^l)	5	16
	DA (RT1 ^a)	Lew (RT1 ^l)	5	11,2
	DA (RT1 ^a)	BN (RT1 ⁿ)	6	10,8
Middle Responder	Lew (RT1 ^l)	AUG (RT1 ^c)	5	15,6
	DA (RT1 ^a)	AUG (RT1 ^c)	5	11,2
	Lew (RT1 ^l)	PVG (RT1 ^c)	5	32,6
	Lew (RT1 ^l)	BN (RT1 ⁿ)	5	48,4
	AUG (RT1 ^c)	BN (RT1 ⁿ)	5	45
	PVG (RT1 ^c)	BN (RT1 ⁿ)	5	36,2
	BN (RT1 ⁿ)	AUG (RT1 ^c)	5	63
Low Responder	DA (RT1 ^a)	PVG (RT1 ^c)	5	>100
	BN (RT1 ⁿ)	PVG (RT1 ^c)	5	>100
	PVG (RT1 ^c)	DA (RT1 ^a)	5	>100
	Lew (RT1 ^l)	DA (RT1 ^a)	5	>100
	BN (RT1 ⁿ)	DA (RT1 ^a)	5	>100
	AUG (RT1 ^c)	DA (RT1 ^a)	5	>100
	BN (RT1 ⁿ)	Lew (RT1 ^c)	4	>100

D. Chimärismus und adoptiver Zelltransfer

Die Lebertransplantation spielt in der Organtransplantation eine Sonderrolle, da immunologische Komplikationen wie zum Beispiel chronische Transplantatabstoßungen seltener auftreten. Spontane (peripher erworbene) Toleranz wurde nach allogener Lebertransplantation für eine Reihe von Stammkombinationen zwischen genetisch unterschiedlichen Inzuchtratten beschrieben (Kamada and Wight 1984). Zwei grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen werden mit diesem Phänomen in Verbindung gebracht. Zum einen die große Menge von löslichen MHC I-Antigenen, die durch die Leber freigesetzt werden (Davies, Pollard et al. 1989; Pollard, Davies et al. 1990), zum anderen die große Anzahl von immunkompetenten „passenger leucocytes“, die sich im Transplantat befinden und nach der Transplantation emigrieren (Steinmuller 1967; Steinman and Witmer 1978; Starzl, Demetris et al. 1992; Schlitt, Raddatz et al. 1993).

In dem Modell der Rattenleber-Retransplantation wurde die essentielle Rolle von immunkompetenten „passenger leucocytes“ aufgezeigt. Lebertransplantate in der Tierstammkombination DA⇒PVG werden spontan akzeptiert und führen zur konsekutiven Akzeptanz von Hauttransplantaten der DA-Spender. Nach Transplantation der DA-Leber auf einen PVG-Empfänger wird der größte Teil der intrahepatischen spenderspezifischen immunkompetenten Zellen innerhalb ca. 3 Wochen durch Empfängerzellen ersetzt. Entnimmt man eine DA-Leber 3 Wochen nach ORLT wieder, befinden sich demnach nur noch geringe Mengen von Spenderzellen im Transplantat. Wird diese DA-Leber erneut in einen zweiten PVG Empfänger transplantiert, so akzeptiert dieser Empfänger Hauttransplantate nur für ca. 50 Tage. Diese Effekte sind spenderspezifisch, was durch die Hauttransplantation von Drittierstämmen nachgewiesen wurde, die nach 10-12 Tagen abgestoßen wurden (Sriwatanawongsa, Davies et al. 1995). Diese Versuche wiesen nach, daß spenderabgeleitete immunkompetente Zellen in der Induktionsphase zur Transplantatakzeptanz ohne Immunsuppression eine wichtige Rolle spielen. Sun et al. benutzten ein Bestrahlungsexperiment an Ratten, um die gleichen Phänomene zu beschreiben (Sun, McCaughan et al. 1995). Im Rattenlebertransplantationsmodell DA⇒PVG entwickeln die Empfänger (PVG-Tiere) eine spezifische Toleranz gegenüber Antigenen des Spenders (DA-Tiere). Bestrahlt man die Spender 7 Tage vor der Organentnahme mit 10 Gy, so führt das zum Absterben eines großen Teils der immunkompetenten Zellen. Transplantiert man diese bestrahlten Organe, so werden die Lebertransplantate 12-14 Tage nach der Transplantation

abgestoßen. Dieses läßt sich unterbinden, indem man die Leber des bestrahlten DA-Tieres zunächst für drei Tage in ein zweites, nicht bestrahltes DA-Tier transplantiert. Nach 72 Stunden wird die Leber entnommen und wiederum auf ein PVG-Tier transplantiert. Nachdem dieses Lebertransplantat wieder eine gewisse Anzahl immunkompetenter Zellen enthält, entwickelt das PVG-Empfängertier wiederum eine spezifische Toleranz. Diese Ergebnisse ließen sich auch in anderen Tiermodellen nachvollziehen (Maus, Affe) (Thomas, Carver et al. 1991).

Durch diese Erfahrungen motiviert wurden Versuche unternommen, den Schutz des Transplantates durch spenderabgeleitete immunkompetente Zellen klinisch zu nutzen. Versuche zur Präkonditionierung durch die additive Gabe spenderabgeleiteter immunkompetenter Zellen ca. sieben Tage vor Transplantation vermindern Abstoßungsreaktionen ohne chronische Immunsuppression in weiteren Tierstämmen (Ratte, DA⇒Lewis), die sonst innerhalb von 10 Tagen abgestoßen würden. Auch in der humanen Lebertransplantation wurde die Frequenz von Rejektionen durch spenderabgeleitete Transfusionen vor der Lebertransplantation gesenkt. Bei insgesamt 127 Lebendspenden-Lebertransplantationen konnte die Abstoßungsfrequenz nach Lebertransplantation durch die Gabe spenderabgeleiteter Blutprodukte vor der Lebertransplantation um 25% reduziert werden (Reed, Pirsch et al. 1991; Brennan, Mohanakumar et al. 1995).

Die Abstoßungsfrequenz beträgt unter immunsuppressiver Therapie in der klinischen Lebertransplantation ca. 30-60% abhängig vom Schema der Induktionstherapie (Neuhaus, Blumhardt et al. 1995). Nach Transplantation einer Leber kommt es, bedingt durch diese Zelltransplantation, innerhalb der ersten 28 Tage regelmäßig zu einem Chimärismus (Nachweis von Spenderantigenen im peripheren Blut des Empfängers) der Patienten (Starzl, Demetris et al. 1992; Jonsson, Hogan et al. 1997), der zum Teil auch nach mehreren Jahren noch nachweisbar ist und mit der Frequenz von Abstoßungen korreliert. Starzl et al. konnten ca. 70 Patienten nach Lebertransplantation von der Immunsuppression entwöhnen, ohne daß schwerwiegende Komplikationen auftraten (Mazariegos, Reyes et al. 1997). Inwieweit dieses Phänomen des Chimärismus hierbei eine toleranzinduzierende Wirkung hat oder lediglich Folge einer verbesserten Immunsuppression ist, ist in der Literatur noch nicht endgültig geklärt.

Auf der Basis dieser Ergebnisse haben in den letzten Jahren nun mehrere Zentren (Tsaroucha, Ricordi et al. 1997) weltweit angefangen, spenderabgeleitete immunkompetente Zellen innerhalb der ersten Woche nach der Transplantation von Nieren und Lebern zu transfundieren (Knochenmark, Stammzellen). In klinischen Studien an nieren- und

lebertransplantierten Patienten führte dies zu einer reduzierten Frequenz von Abstoßungsreaktionen und einem signifikant verbesserten Transplantat- und Patientenüberleben (Ricordi, Karatzas et al. 1997; Ricordi, Karatzas et al. 1997). Den Empfängern von Lebertransplantaten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 5×10^8 /kg Körpergewicht periphere Knochenmarkszellen des Spenders infundiert und damit das 1-Jahres-Transplantatüberleben von 72% auf 92,5% verbessert. Trotzdem ist es bis jetzt noch nicht gelungen, bei Patienten Toleranz zu induzieren, also ohne Immunsuppression eine stabile Transplantatfunktion zu erhalten.

E. Bedeutung co-stimulatorischer Signale für die Transplantationsmedizin

Erst Ende der achtziger Jahre konnte gezeigt werden, daß neben dem T-Zell Rezeptor, der bis dahin extensiv erforscht wurde, auch ein co-stimulatorisches Signal notwendig ist, um T-Zellen vollständig zu aktivieren (*Abbildung 3*) (Jenkins and Schwartz 1987). Erste Experimente von Jenkins et al. zeigten, daß T-Lymphozyten in Abwesenheit des co-stimulatorischen Signals nicht weiter proliferierten und inaktiviert wurden. Die Entdeckung, daß eine T-Zell Inaktivierung, auch T-Zell-Anergie genannt, direkt abhängig ist von der IL-2 Produktion führte zu der Suche eines Moleküls, das maßgeblich die IL-2 Produktion beeinflusst (DeSilva, Urdahl et al. 1991). Hieraus resultierte die Identifikation des CD28:B7-Signals als einer der wichtigsten Einflußgrößen auf das co-stimulatorische Signal (Jenkins and Schwartz 1987; Harding, McArthur et al. 1992). In den nachfolgenden Jahren wurden weitere Rezeptor-Ligandenpaare für co-stimulatorische Signale z.B. CD154:CD40, CD2:CD58, CD18:CD54 entdeckt (Hollander, Zuklys et al. 1999). In der Abfolge der co-stimulatorischen Signale und der T-Zell-Aktivierung gibt es eine zeitliche Hierarchie. Zunächst erfolgt die Bindung von CD40:CD154 direkt nach Aktivierung des 1. Signals durch den TCR (*Abbildung 5*). Dies stellt den ersten Schritt bei der Initialisierung des co-stimulatorischen Signals dar und ist meist unabhängig von der Bindung von CD28 und B7 (Roy, Aruffo et al. 1995; Foy, Aruffo et al. 1996; Jaiswal, Dubey et al. 1996). Die Bindung von CD154 an seinen Liganden CD40 führt dann zur Expression von B7.2, B7.1 und ICAM-1 (CD54) auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC), was zu der Veränderung des Status der APC und konsekutiv zur T-Zell-Aktivierung über CD28 und LFA-1-Rezeptoren führt. Erst nach Aktivierung des 1. und 2. Signals entwickeln sich T-Zellen von einem ruhenden Status über verschiedene Mechanismen zu einem aktivierten Status mit Mitosen (Sayegh and Turka 1998). Es resultiert die Produktion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, die den Fortgang der

immunologischen Reaktion unterstützen (Fraser, Irving et al. 1991; Jenkins, Taylor et al. 1991; Schwartz 1997; Hollander, Zuklys et al. 1999).

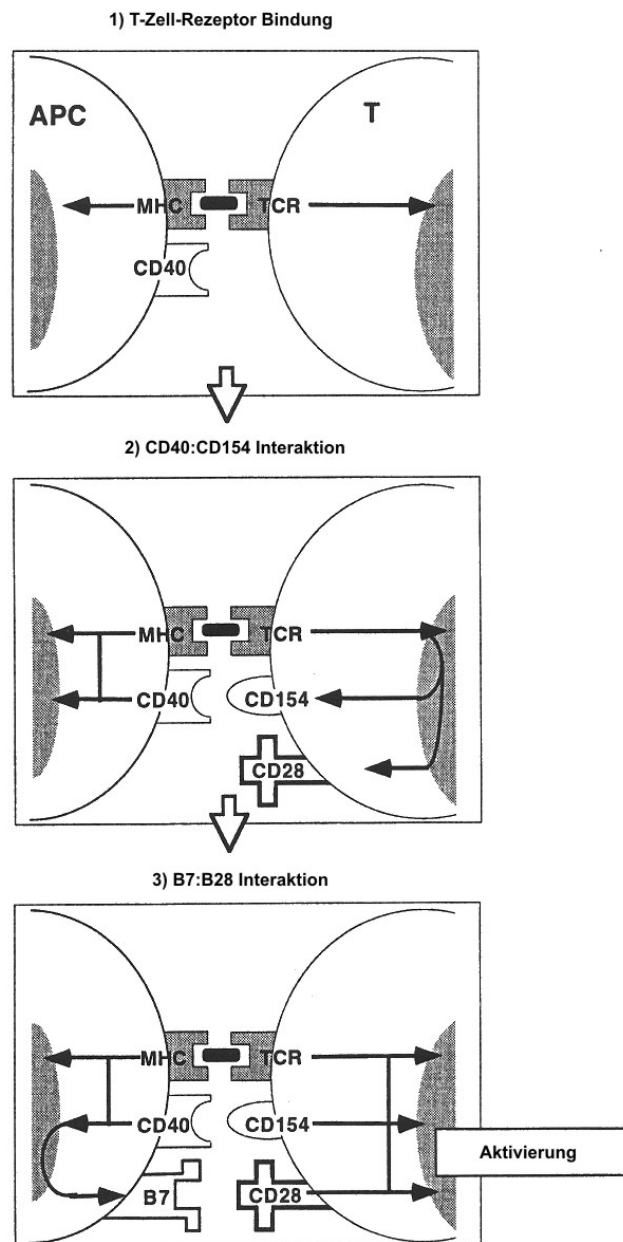


Abbildung 5: Die Interaktion zwischen Antigen-präsentierender Zelle (APC) und T-Zelle führt zur Steigerung der co-stimulatorischen Moleküle an der Oberfläche von Lymphozyten (modifiziert nach Hollander, Zuklys et al. 1999).

Interleukin-2, ein auto- und parakriner Wachstums- und Differenzierungsfaktor, ist nach erfolgtem co-stimulatorischen Signal zentral für die Regulierung des 3. Signals der T-Zell-Aktivierung verantwortlich. Die IL-2 Gen-Expression regelt die Entwicklung der ruhenden zur aktivierten T-Zelle. Der Promoter des IL-2-Gens beinhaltet verschiedene konstitutive und induzierbare Transkriptionsfaktoren, wie OCT-1, AP-1, NF κ B, NFAT und NFIL2A (Jain, Loh et al. 1995). Die Aktivierung von NFAT und NFIL2A ist abhängig von T-Zellrezeptor-induzierten Kalzium-Signalen und wird durch die immunsuppressiven Medikamente Cylosporin A und Tacrolimus inhibiert (Schreiber and Crabtree 1992; Ruhlmann and Nordheim 1997). Reduzierte oder ausbleibende Sekretion von IL-2 ist mit primären und sekundären Immundefiziten der zellulären und humoralen Funktionen von T-Zellen assoziiert worden (Sadlack, Merz et al. 1993). Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der genauen IL-2-Regulation bei der Regulation des Immunsystems, welche maßgeblich über co-stimulatorische Moleküle erfolgt. Der am besten untersuchte Teil des co-stimulatorischen Signals ist die Bindung von CD28 an B7.1 und B7.2 auf den APC, die nach Bindung des TCR erfolgt. Das zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie gehörende CD28 wird als ein disulfidverknüpftes Homodimer aus 44KD schweren Polypeptiden exprimiert. Jede der Ketten weist eine extrazelluläre IG-V-Domäne, eine Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen Teil ohne eigene Kinaseaktivität auf. Die Gene von CD28 sind auf dem menschlichen Chromosom 2 lokalisiert. CD28 erhöht die Transkription und Stabilität der IL-2 mRNA und somit die Proliferation von T-Zellen (Lindsten, June et al. 1989; Jenkins, Taylor et al. 1991). Weiterhin wird das anti-apoptotische Protein Bcl-X_L vermehrt exprimiert und damit das Überleben von aktivierten mononukleären Zellen verlängert (Boise, Minn et al. 1995; Sperling, Auger et al. 1996).

CTLA-4 (CD152) hingegen ist ein Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Lymphozyten, welches frühzeitig die Rezeptor-vermittelte Signalkaskade unterbricht und direkt abhängig von der CD28:B7-Bindung ist (Walunas, Lenschow et al. 1994; Lee, Chuang et al. 1998). Die Gene von CTLA-4 sind enggekoppelt zu CD28 auf dem Chromosom 2. Im Gegensatz zu CD28 beeinflusst CTLA-4 die Regulierung der T-Zellen negativ, verhindert also deren Aktivierung (Krummel and Allison 1996; Walunas, Bakker et al. 1996; Lee, Chuang et al. 1998). Bei Mäusen führt die Blockade von CTLA-4 durch monoklonale Antikörper in-vitro zur Proliferation der T-Zellen, wohingegen CTLA-4-Applikation und -Vernetzung die Bildung von IL-2 und die Progression des Zellzyklus der T-Zellen reduziert (Krummel and Allison 1996).

Die Komplexität der CD28/CTLA-4 Rezeptorinteraktionen resultiert aus der Tatsache, daß es zwei natürliche Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) für CD28 und CTLA-4 gibt (Freeman, Freedman et al. 1989; Linsley, Brady et al. 1991; Azuma, Ito et al. 1993; Hathcock, Laszlo et al. 1993; Sansom and Hall 1993). Obwohl diese beiden Liganden nur mit dem jeweiligen Rezeptor interagieren, sind sie nur zu etwa 25% in ihrer Gensequenz miteinander identisch. Dies führte in der Vergangenheit zu Spekulationen, daß beide Signale verschiedene Funktionen haben. B7.1 und B7.2 findet man auf Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Monozyten und aktivierten B-Zellen. Sie können aber nach Aktivierung auch auf verschieden anderen Zellreihen wie zum Beispiel T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Hathcock, Laszlo et al. 1993; Inaba, Witmer-Pack et al. 1994; Larsen, Ritchie et al. 1994). B7.2 ist häufiger exprimiert und wird schneller hochreguliert als B7.1 (Borriello, Sethna et al. 1997). Die Expression von B7.1 und B7.2 wird durch CD40, Interferon- γ , Interferon- α und den granulocyte-growth-factor (GM-CSF) gesteigert (Gimmi, Freeman et al. 1991; Larsen, Ritchie et al. 1994; Stack, Lenschow et al. 1994; Liu, Li et al. 1999; Radvanyi, Banerjee et al. 1999). Andere Zytokine wie IL-4 und IL-10 scheinen dahingegen die Expression von B7.1 und B7.2 zu reduzieren (Ding, Linsley et al. 1993; Buelens, Willems et al. 1995; Schweitzer and Sharpe 1999). Diese Regulation wesentlicher, bei der Transplantatabstoßung beteiligter Moleküle führte zu Tierexperimenten bei denen der Einfluß co-stimulatorischer Signale auf den Verlauf der Abstoßung geprüft wurde. Es wurden verschiedene co-stimulatorische Signale miteinander kombiniert. Das größte Interesse galt dabei dem frühesten Schritt der Co-Stimulation, also der Bindung von CD40 und seinem Liganden sowie dem konsekutiven Signal CD28:B7.

CTLA-4Ig ist ein Protein, das mit hoher Affinität an B7.1 und B7.2 bindet und damit die Bindung von CD28:B7 verhindert (Linsley, Brady et al. 1991). Tierexperimente zeigten, daß eine kurzfristige CTLA-4Ig-Therapie zum Zeitpunkt der Transplantation zu einer Langzeit-Akzeptanz von menschlichen Inselzellen in Mäusen und allogenen Herztransplantaten in Ratten führt (Lenschow, Zeng et al. 1992). Verlängertes Transplantatüberleben wurde an allogenen Nieren- und Lungentransplantaten aufgezeigt (Sayegh and Turka 1998). Weiterhin konnte mit einer B7-Blockade auch die chronische Abstoßung erfolgreich behandelt werden (Azuma, Chandraker et al. 1996; Russell, Hancock et al. 1996). Die Relevanz von B7-Expression im Spenderorgan versus Empfänger-B7-Expression wurde in Herztransplantationen bei Mäusen aufgezeigt (Mandelbrot, Furukawa et al. 1999; Szot, Zhou et al. 2000). Ob diese Effekte auf das Herz begrenzt sind, das im Gegensatz zu Leber, Nieren und Haut relativ wenig APC's enthält, ist noch nicht geklärt. Die Anwendung von CD28-

Antagonisten in „nicht-humanen Primaten“ hat bei Transplantation von allogenen Inselzellen und Nieren zwar zu einer Verlängerung der Transplantatakzeptanz geführt, allerdings wurden alle Transplantate innerhalb von 100 Tagen abgestoßen (Levisetti, Padrid et al. 1997; Ossevoort, Ringers et al. 1999). Diese Daten zeigten, daß die Blockade von CD28 ein wichtiges, aber nicht ausreichendes Mittel zur Induktion von Langzeitakzeptanz von Transplantaten ist, so daß man Kombinationstherapien mit anti-CD40-Antikörpern angeschlossen hat. Diese Kombination bietet sich an, da anti-CD40-Antikörper den 1. Schritt der co-stimulatorischen Aktivierung inhibieren und damit additiv wirksam sind. Hierdurch ließ sich in Primaten eine Langzeitakzeptanz von Nieren und Inselzellen auch lange nach Abbruch der Therapie erreichen (Kirk, Harlan et al. 1997; Kenyon, Chatzipetrou et al. 1999; Kenyon, Fernandez et al. 1999). Widersprüchliche Daten liegen für hoch immunogene Hauttransplantate und die Kombinationstherapie von anti-CD40 und CTLA-4Ig vor (Li, Li et al. 1999). In diesen Transplantationsmodellen konnten die immunsuppressiven Effekte der anti-CD40- und CTLA-4Ig-Therapie durch die zusätzliche Applikation von spenderabgeleiteten Transfusionen verbessert werden (Lin, Bolling et al. 1993; Iwakoshi, Mordes et al. 2000).

Die kombinierte CD40/CD40L- und CD28/B7-Blockade nach Transplantation führt nicht nur zur Reduktion proliferierender Lymphozyten, sondern auch zu einer gesteigerten Rate von apoptotischen Zellen. Eine Blockade dieses geplanten Zelltodes führt in anderen Modellen zum Abbruch von immunologischer Toleranz (Iwakoshi, Mordes et al. 2000), was in diesem Zusammenhang langfristiges Transplantatüberleben ohne kontinuierliche Immunsuppression, meist nach einer kürzeren Induktionsphase, bedeutet. Bei der Entwicklung von Toleranz sind wegen der anti-proliferativen und pro-apoptotischen Potenz gegenüber-T-Lymphozyten Zytokine wie IL-2 und IFN- γ von Bedeutung, die gleichzeitig bei der Entwicklung von Abstoßungsepisoden eine herausragende Rolle spielen (Dai, Konieczny et al. 1998). Dies konnte in Mäusen, die kein IL-2 produzieren konnten, nachgewiesen werden. Hier führte die Abwesenheit von IL-2 zu einem vorzeitigen Tod der Versuchstiere, die sonst langfristig überlebten. Diese Versuche unterstreichen, daß die Entwicklung von Toleranz ein aktiver Prozeß ist, für den eine intakte TCR-Aktivität notwendig ist. Diese Mechanismen erklären zusätzlich, daß der positive Effekt von Blockade der Co-Stimulation auf die Entwicklung von Toleranz bei simultaner Gabe von Calcineurin-Inhibitoren (Tacrolimus, Cyclosporin A), die IL-2 blockieren, nur vermindert auftritt.

Die klinische Anwendung von Präparaten wie anti-CD 40 und CTLA-4Ig steckt noch in den Anfängen. Die Erkenntnisse, daß die Blockade von CD28:B7 in-vitro bei gleichzeitigem

Antigenstimulus des TCR zu einer Nichtreaktivität der T-Zelle gegenüber dem spezifischen Antigen führt, wurde zur Reduktion der Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD) in der humanen Knochenmarktransplantation genutzt. Die GvHD in der klinischen Knochenmarktransplantation tritt auf, wenn transplantierte Spenderzellen die Empfängerzellen als alloren und fremd erkennen (Billingham 1967). Hieraus resultiert eine gegen den Empfänger gerichtete Immunantwort, die bis zum Multiorganversagen und Tod führen kann. In diesen Versuchen wurden die Spenderzellen in-vitro vor Transplantation mit bestrahlten Empfängerzellen in Anwesenheit von CTLA-4Ig kultiviert (Guinan, Boussiotis et al. 1999) und damit die GvHD-Frequenz gesenkt. Weitere Ergebnisse über die in-vivo Anwendung von CTLA-4Ig bei Patienten mit einer immunologisch bedingten Psoriasis vulgaris liegen vor. Theoretisch geht man hier davon aus, daß CTLA-4Ig zu einer Reduktion der aktivierten in die Haut infiltrierenden T-Zellen führt und deren Apoptoserate erhöht, so daß die Erkrankung milde verläuft. Bei 46% Patienten mit einer stabilen Psoriasis vulgaris war nach 4 Infusionen CTLA-4Ig eine 50%-ige Verbesserung der Aktivität erreicht worden (Abrams, Lebowitz et al. 1999). Die klinische Verbesserung korrelierte hierbei mit der Dosis des angewandten CTLA-4Ig. Korrelationen fanden sich zusätzlich zu der Zahl der hautinfiltrierenden T-Lymphozyten. Eine Steigerung der Apoptoseaktivität konnte nicht gezeigt werden, was für eine antiproliferierende Wirkung des CTLA-4Ig auf die T-Zellen spricht. Für die Blockade von CD40 durch einen CD154-Antikörper wurden Phase I/II Studien bei nierentransplantierten Patienten durchgeführt. Diese Studien mußten allerdings wegen einer hohen Frequenz von venösen und arteriellen Thrombosen abgebrochen werden.

Zur Zeit beginnen die ersten Phase I-Studien zur Blockade co-stimulatorischer Signale mit CTLA-4Ig nach Nierentransplantation in der Klinik. Aufgrund der nicht ausreichenden immunsuppressiven oder toleranzinduzierenden Wirkung von CTLA-4Ig in Tierversuchen erfolgt die Therapie in Kombination mit Mycophenolate Mofetil und Steroiden. Dies Therapieschema eliminiert die Calcineurin-Inhibitor-assoziierten Nebenwirkungen, macht aber weiterhin eine Dauertherapie mit immunsuppressiven Präparaten notwendig.

Es gibt weitere Möglichkeiten, um die Effizienz der Blockade co-stimulatorischer Signale zu erhöhen. Zum einen hat die Modulation des 1. und 2. Signals der T-Zellaktivierung verbesserte Ergebnisse, verglichen mit der alleinigen Blockade co-stimulatorischer Signale gezeigt (Yin and Fathman 1995; Li, Li et al. 1999; Wells, Li et al. 1999). Ein anderer Ansatz besteht darin, die Blockade des co-stimulatorischen Signals mit adoptiven Zelltransfer zu kombinieren. Dies verbessert die Effizienz einer alleinigen Blockade co-stimulatorischer Signale zur Toleranzinduktion im Tiermodell signifikant (Lin, Bolling et al. 1993; Iwakoshi,

Mordes et al. 2000). Untersuchungen zur kumulativen Wirkung und der Mechanismen dieser beiden Verfahren liegen zur Zeit nicht vor. Im Rattenlebertransplantationsmodell konnte 2001 von Yan et al. gezeigt werden, daß die zusätzliche Applikation von spenderabgeleitetem Antigen zu einer gesteigerten Rate apoptotischer T-Lymphozyten führt (Yan, Shastri et al. 2001). Hierdurch verlängerte sich das Überleben nach allogener ORLT signifikant. Dieser Mechanismus zur Verlängerung des Überlebens nach Organtransplantation ergänzt sich zu der antiproliferativen und pro-apoptotischen Wirkung der CTLA-4Ig-Therapie und legt eine additive oder kumulative Effizienz der beiden Verfahren nahe. Über die Effizienz und optimale zeitliche Abfolge der Blockade co-stimulatorischer Signale und adoptivem Zelltransfer nach ORLT liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Untersuchungen vor.

II. Fragestellung:

Um die biologische Signifikanz und die Mechanismen des co-stimulatorischen Signals in Kombination mit spenderabgeleitetem adoptiven Zelltransfer zu prüfen, verwendeten wir das etablierte Modell der mikrochirurgischen orthotopen Lebertransplantation in der Ratte. Voruntersuchungen haben die immunsuppressive Potenz von CTLA-4Ig sowie adoptivem Zelltransfer nach Organtransplantation gezeigt und legten eine kumulative Wirkung der beiden Verfahren nahe.

1. Führt die mehrfache Gabe von Spenderantigen innerhalb einer Woche vor der Transplantation zu einer Verzögerung der Immunantwort des Empfängers?
2. . Können die Effekte der Vorbehandlung mit spenderabgeleiteten Zellen vor ORLT durch die synchrone Therapie mit CTLA-4Ig verbessert werden?
3. Ist dieser Effekt spenderspezifisch?
4. Ist die mehrfache zusätzliche Applikation von spenderabgeleitetem Antigen nach Transplantation in der Lage, die Immunantwort des Empfängers nach ORLT zu verzögern?
5. Können die immunsuppressiven Effekte von CTLA-4Ig durch zusätzliche Gabe von spenderabgeleitetem Antigen nach ORLT verbessert werden? Sind diese Effekte antigen-spezifisch?
6. Ist es möglich, mit einer CTLA-4Ig-Monotherapie nach ORLT eine Langzeittransplantatakzeptanz zu erreichen?

III. Material und Methoden:

A. Tierwahl und Tierhaltung

Alle Tierversuche waren von der zuständigen Behörde ordnungsgemäß genehmigt und die vom Gesetz geforderten Voraussetzungen zur Haltung und Überwachung der Versuchstiere während des Versuches ihre ordnungsgemäße Entsorgung nach Beendigung der Versuche durch den zuständigen Veterinär und ausgebildete Tierpfleger der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums des Virchow-Klinikums Berlin waren gegeben. Für die Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche, rückgezüchtete Rattenrassen verwendet. Diese Tiere wurden frei von spezifischen Pathogenen von der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland, geliefert und in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Virchow-Klinikum, gehalten. Nach einer Akklimatisierungsphase von mindestens einer Woche mit einer Tag/Nacht-Zeitschaltung von jeweils 12 Stunden wurden die Tiere für die Versuche verwendet und nach den Operationen wieder in den gleichen Raum gebracht. Alle verwendeten Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und Standardnagerfutter. Die Versuche wurden mit männlichen DA (Dark Agouti, MHC: RT1^a), BN (Brown Norway MHC: RT1ⁿ) und Lewis (MHC: RT1^l) Ratten im Alter von 8-14 Wochen und mit einem Gewicht von 250-300 g durchgeführt.

B. Behandlung mit CTLA-4Ig und Milzzellen

Die Behandlung mit dem Fusionsprotein CTLA-4Ig erfolgte bei jeder Gabe in einer Dosierung von 0,5 mg intraperitoneal (*i.p.*). Milzzellen wurden in Kurznarkose über die Penisvene der Ratten intravenös appliziert. Bei jeder Gabe wurden den Ratten $2,5 \times 10^8$ Milzzellen appliziert.

B.1 Separation von Milzzellen

Die Milzen wurden von ca. 200-250 g schweren DA- oder BN-Ratten steril gewonnen. Nach Entnahme der Milz wurde diese mit ausreichend RPMI in einer sterilen Schale begossen. Dann erfolgte die Zerkleinerung des Gewebes mit einem Glasschliffstopfen und das anschließende Durchmischen der Zellen. Die zerkleinerte Milz wurde nun durch ein

Nylonnetz filtriert. Nach 20-minütiger Zentrifugation erfolgte die Separation der mononukleären Milzzellen über einem Ficoll-Hypaque Gradienten (Histopaque 1083, Sigma Chemicals, Dichte 1.077). Die über dem Dichtegradienten separierte mononukleäre Lymphozytenpopulation wurde anschließend in PBS (phosphate buffered saline) aufgenommen und 2 x gewaschen. Die gewonnene Lösung wurde nochmals mit 300 g über 20 Minuten zentrifugiert. Die Zählung der Zellen und deren Vitalitätsprüfung erfolgte nach Resuspendierung mit der Trypanblau-Färbung.

C. Experimenteller Plan

Es wurden in 13 Gruppen 163 allogene Transplantationen DA \Rightarrow Lewis durchgeführt. Die kalte Ischämiezeit nach Kochsalzkonservierung betrug ca. 60 Minuten. Zunächst erfolgte ein Vorversuch zur Relevanz der postoperativen Applikation von spenderabgeleiteten Antigenen. Hieran schloss sich der Hauptversuch an. Dieser unterteilte sich in 3 Gruppen, die anschließend in Untergruppen aufgeteilt wurden. Die Hauptgruppen wurden durch das zeitliche Verhältnis von Therapie und Rattenlebertransplantation definiert (*Abbildung 6*). In der ersten Gruppe wurden Tiere mit 5 verschiedenen Therapieschemata vor der Transplantation vorbehandelt (präkonditioniert). Die Tiere erhielten in verschiedenen Kombinationen CTLA-4Ig zur Blockade des co-stimulatorischen Signals und spenderabgeleitete oder nicht spenderabgeleitete Milzzellen. In der 2. Gruppe wurden die Tiere in 2 Untergruppen aufgeteilt. Ein Teil der Tiere fungierte als Kontrollgruppe und erhielt keine weitere medikamentöse Therapie. Der andere Teil wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4,7 nach der Transplantation nachbehandelt. Die 3. Gruppe wurde wiederum analog zur ersten Gruppe mit 5 Therapieschemata behandelt. Die Tiere erhielten CTLA-4Ig, spenderabgeleitete oder nicht spenderabgeleitete Milzzellen in verschiedenen Kombinationen. Die Therapie wurde erst ab dem 3. postoperativen Tag begonnen. In jeder Untergruppe wurden 13 Tiere transplantiert. Bei 3 Tieren erfolgte die Tötung am Tag 6 nach ORLT. Weitere 3 Tiere wurden am Tag 12 getötet. Die übrigen Tiere wurden eingeschlossen, um das Langzeitüberleben unter der spezifischen Therapie zu evaluieren.

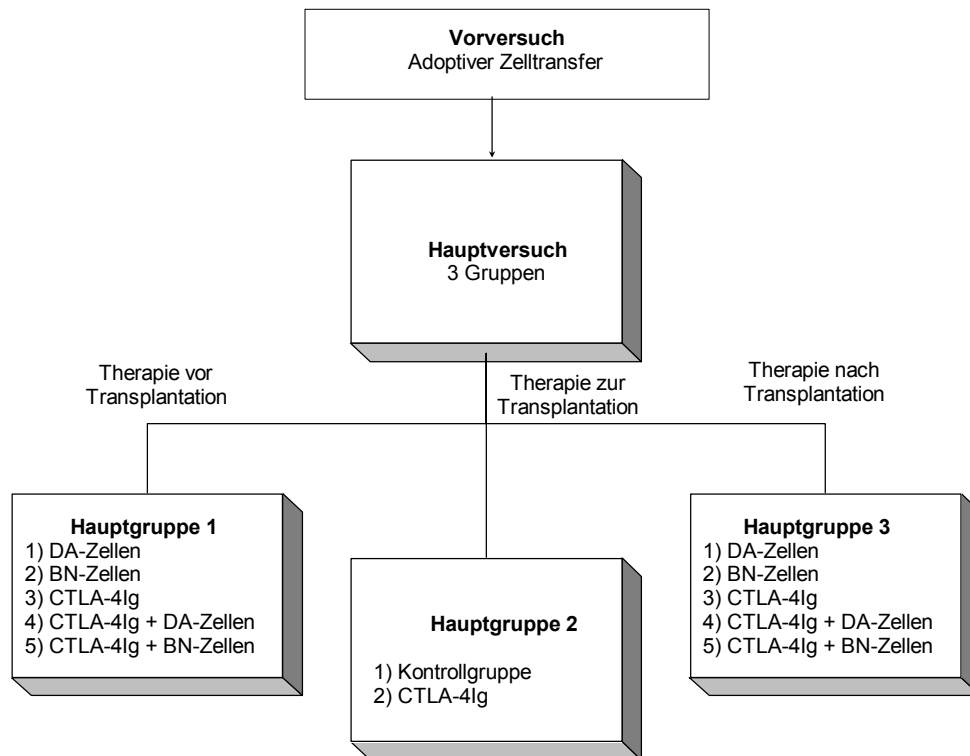


Abbildung 6: Nach einem Vorversuch, in dem ausschließlich der Effekt des adoptiven Zelltransfers nach der Transplantation getestet wurde, erfolgte der Hauptversuch mit der Einteilung in die 3 Hauptgruppen, die sich durch das zeitliche Verhältnis der Therapie zur Transplantation definiert. Hauptgruppe 1 wurde vor der ORLT behandelt, Hauptgruppe 2 besteht aus der Kontrollgruppe ohne weitere Therapie und einer Gruppe, die ab ORLT mit CTLA-4Ig behandelt wurde, und Hauptgruppe 3 erhielt die Therapie ausschließlich ab dem 3. Tag nach der Transplantation.

C.1 Vorversuch

Im Rahmen eines Vorversuchs wurden 6 Transplantationen DA⇒Lewis mit zusätzlicher Applikation von $2,5 \times 10^8$ spenderabgeleiteten (DA-) Milzzellen in die Penisvene am Tag der Operation und am 4. postoperativen Tag durchgeführt.

C.2 Hauptversuch

Hauptgruppe 1 mit Präkonditionierung vor ORLT

Die Empfängertiere der Gruppe 1.1 erhielten zweimalig spenderabgeleitete DA-Milzzellen 2 und 7 Tage vor der Lebertransplantation. Die Gruppe 1.2 erhielt nicht spenderabgeleitete BN-Milzzellen an den gleichen Tagen. Die Gruppe 1.3 wurde ausschließlich mit 4 Gaben CTLA-4Ig präoperativ behandelt. Die Tiere der Gruppen 1.4 und 1.5 erhielten zusätzlich zu den DA-

Milzzellen (Gruppe 1.4) oder BN-Milzzellen (Gruppe 1.5) die Therapie mit CTLA-4Ig an 4 Tagen präoperativ.

Tabelle 2: Behandlungsschema der Empfänger der Hauptgruppe I, die ausschließlich vor der Transplantation behandelt wurde.

Gruppe	Tag-8	Tag-7	Tag -3	Tag -2	n
1.1		DA		DA	13
1.2		BN		BN	13
1.3	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig	13
1.4	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig+DA	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig+DA	13
1.5	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig+BN	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig+BN	13

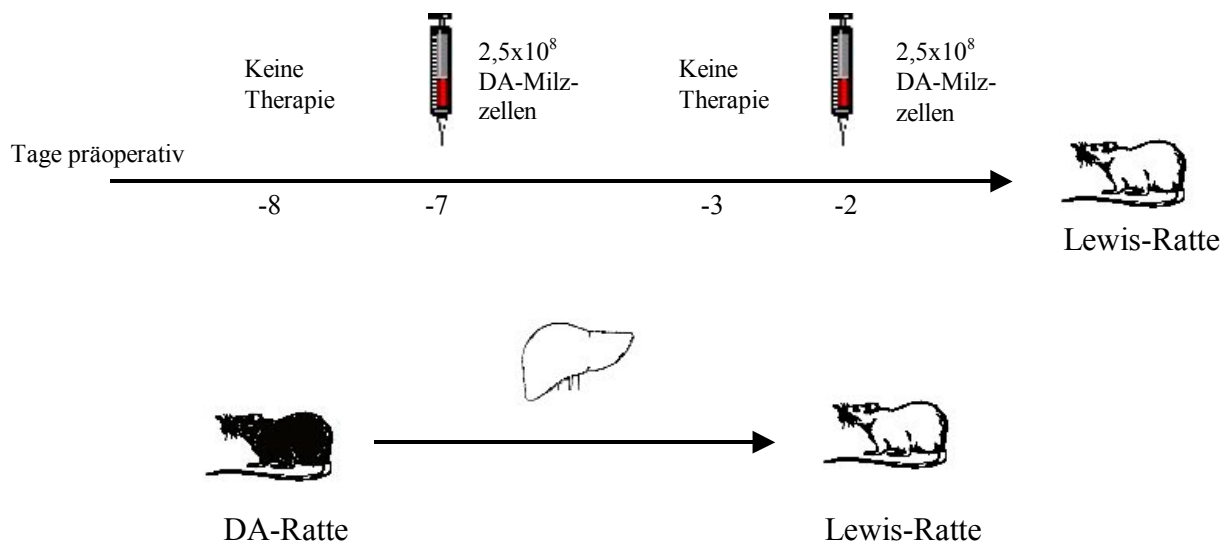


Abbildung 7: Beispielhaft das Therapieschema der Gruppe 1.1. Die Empfängertiere erhalten 7 und 2 Tage präoperativ $2,5 \times 10^8$ spenderabgeleitete DA-Milzzellen. Am Tag 0 erfolgt dann die Lebertransplantation von DA \Rightarrow Lewis.

Hauptgruppe 2: ORLT

Die Tiere der Gruppe 2.1 wurden transplantiert und erhielten keine weitere Therapie und fungieren im weiteren als Kontrollgruppe. Die Gruppe 2.2 erhielt CTLA-4Ig an den Tagen 0, 1, 2, 4 und 7 postoperativ.

Tabelle 3: Behandlungsschema der Empfänger der Hauptgruppe 2, die aus der Kontrollgruppe und einer ausschließlich mit CTLA-4Ig behandelten Gruppe besteht.

Gruppe	ORLT	POD 1	POD2	POD4	POD7	n
2.1						13
2.2	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig	13

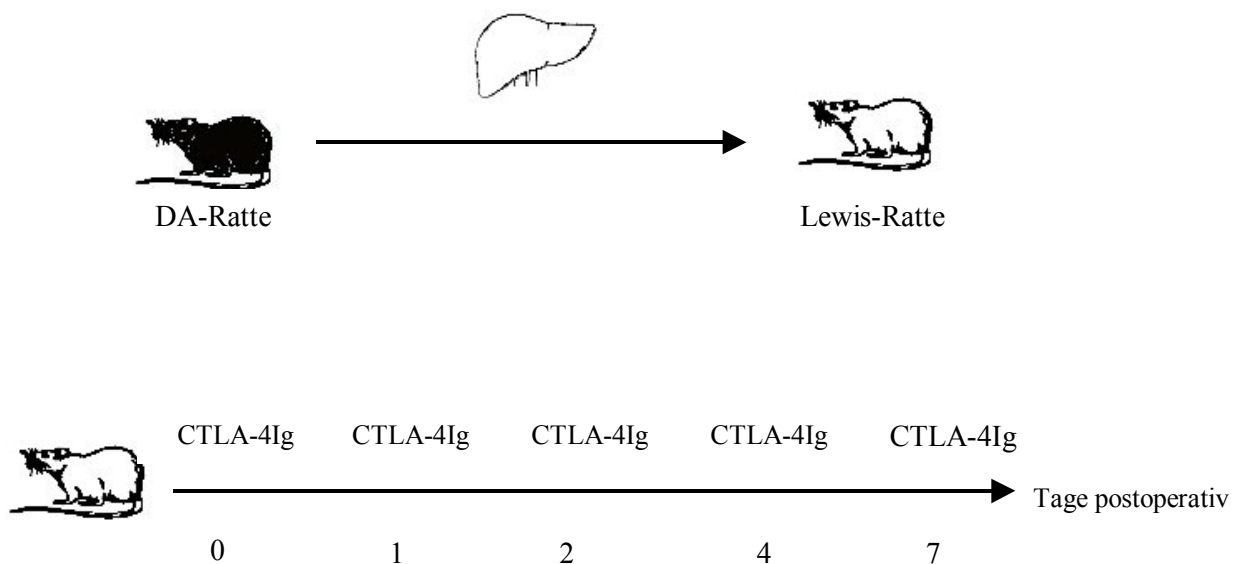


Abbildung 8: Therapieschema der Gruppe 2.2. Die Empfängertiere erhalten an den Tagen 0, 1, 2, 4, und 7 postoperativ nach ORLT 0,5 mg CTLA-4Ig intraperitoneal.

Hauptgruppe 3 mit Behandlung nach ORLT

Die Tiere der Gruppe 3.1 erhielten spenderabgeleitete DA-Milzzellen an dem Tag 4 nach ORLT. Die Gruppe 3.2 erhielt nicht spenderabgeleitete BN-Milzzellen am gleichen Tag. Die Gruppe 3.3 wurde mit 2 Gaben CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 postoperativ behandelt. Die Tiere der Gruppen 3.4 und 3.5 erhielten zusätzlich zu einer Gabe von DA-Milzzellen (Gruppe 3.4) oder BN-Milzzellen (Gruppe 3.5) am Tag 4 die Therapie mit CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 postoperativ.

Tabelle 4: Behandlungsschema der Empfänger der Hauptgruppe 3, die ab dem 3 postoperativen Tag mit den unterschiedlichen Protokollen in Analogie zur Hauptgruppe 1 behandelt wurden.

Gruppe	POD 3	POD 4	n
3.1		DA	13
3.2		BN	13
3.3	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig	15
3.4	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig + DA	13
3.5	CTLA-4Ig	CTLA-4Ig + BN	13

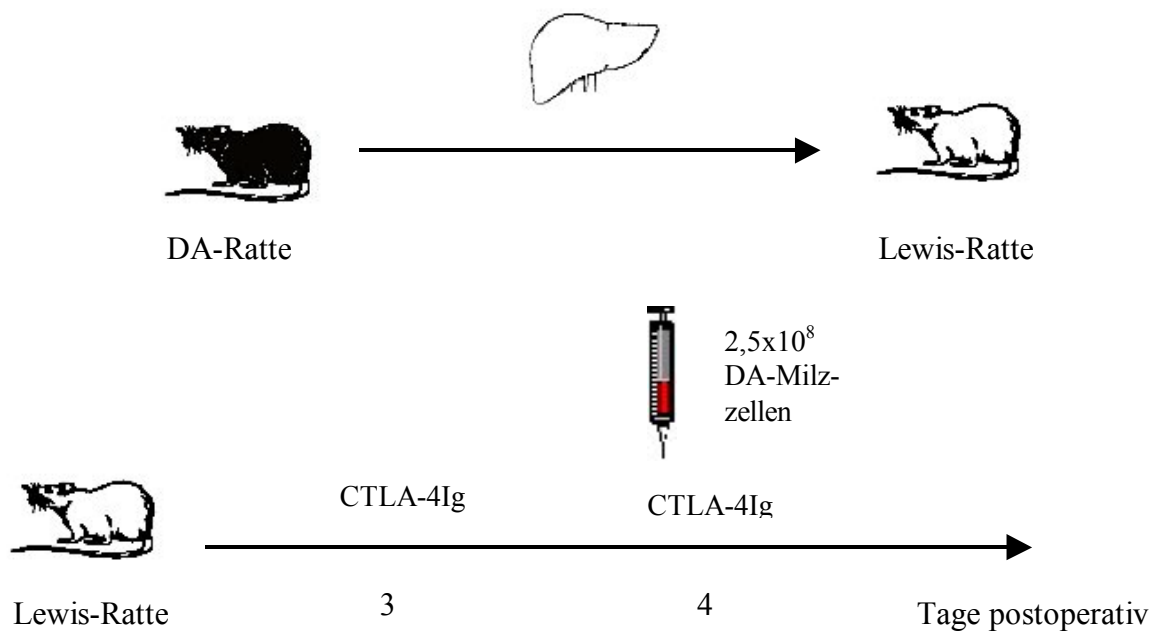


Abbildung 9: Beispielhaft das Therapieschema der Gruppe 3.4. Die Empfängertiere erhalten $2,5 \times 10^8$ spenderabgeleitete DA-Milzzellen am 4. POD. Am Tag 3 und 4 postoperativ erfolgt die Applikation von 0,5 mg CTLA-4Ig i.p.

D. Technik der Lebertransplantation

D.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Sämtliche operative Eingriffe wurden unter Inhalationsnarkose durchgeführt. Die Narkosemittel Isofluran und Lachgas wurden in ein rundwandiges Gefäß eingeleitet. Das Versuchstier wurde anschließend auf einen auf dem Zellstoff stehenden Metallrost gesetzt und erst wieder nach Erreichen einer erfahrungsgemäß ausreichend tiefen Narkose und guter Muskelrelaxation herausgenommen. Anschließend wurde das Tier über dem gesamten Abdomen geschoren und in Rückenlage auf einem Korkbrett fixiert.

D.2 Spenderoperation und Hepatektomie

Alle operativen Eingriffe wurden in einer sauberen, nicht-sterilen, mikrochirurgischen Technik durchgeführt. Die Spenderoperation folgte im wesentlichen der Originalbeschreibung von Lee (Lee, Charters et al. 1973) mit einer Modifikation der Gallengangs-(Zimmermann, Butcher et al. 1979) und Arterienpräparation. Das Abdomen wurde durch eine vom Xyphoid bis zur Blase reichende mediane Laparotomie eröffnet. Zunächst wurde das Ligamentum falciforme bis zur suprahepatischen Vena cava durchtrennt (*Abb. 10*). Die das linke Zwerchfell drainierende subphrenische Vene wurde unterfahren, doppelt mit 6-0 Seide ligiert und durchtrennt.

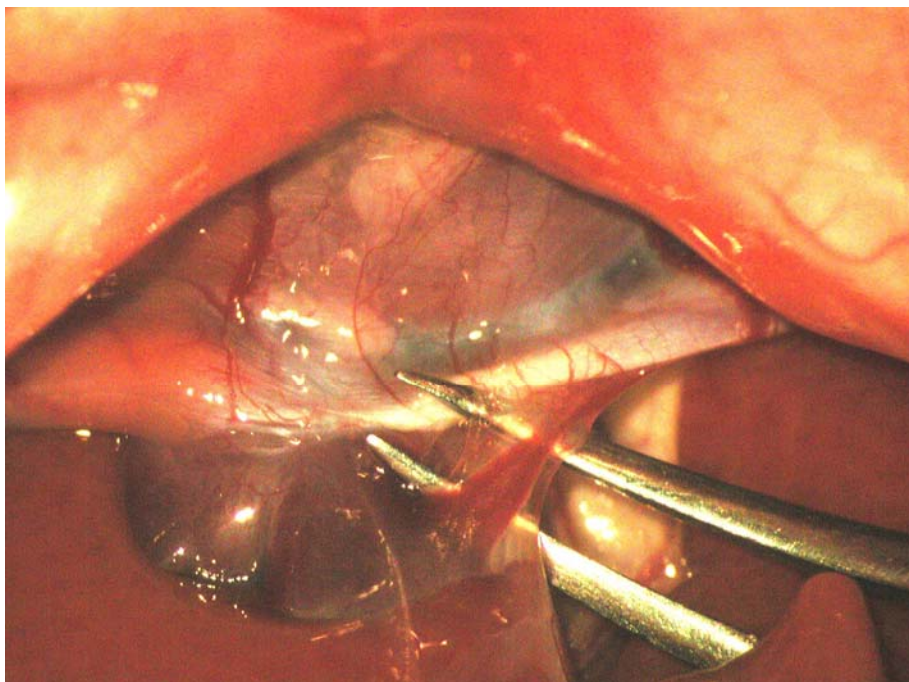


Abbildung 10: Durchtrennung der das linke Zwerchfell drainierenden Vene.

Nach Durchtrennung der linkslateralen Leberbänder wurde der Lobus caudatus mobilisiert, so daß das zwischen Ösophagus und Leberarterie verlaufende arterielle Gefäß durchtrennt werden konnte. Die rechte Vena suprarenalis wurde mit 6-0 Seide einfach ligiert. Nach Herüberschwenken der weitgehend mobilisierten Leber auf die linke Seite des Tieres erfolgte die scharfe Lösung des retrocavalen Bindegewebes von Höhe der rechten Nebennierenvene bis zur Einmündung der Lebervenen. Die Präparation des Leberhilus begann mit Darstellung, Unterfahung und doppelter Ligatur der präpylorischen Vene (*Abb. 11*).

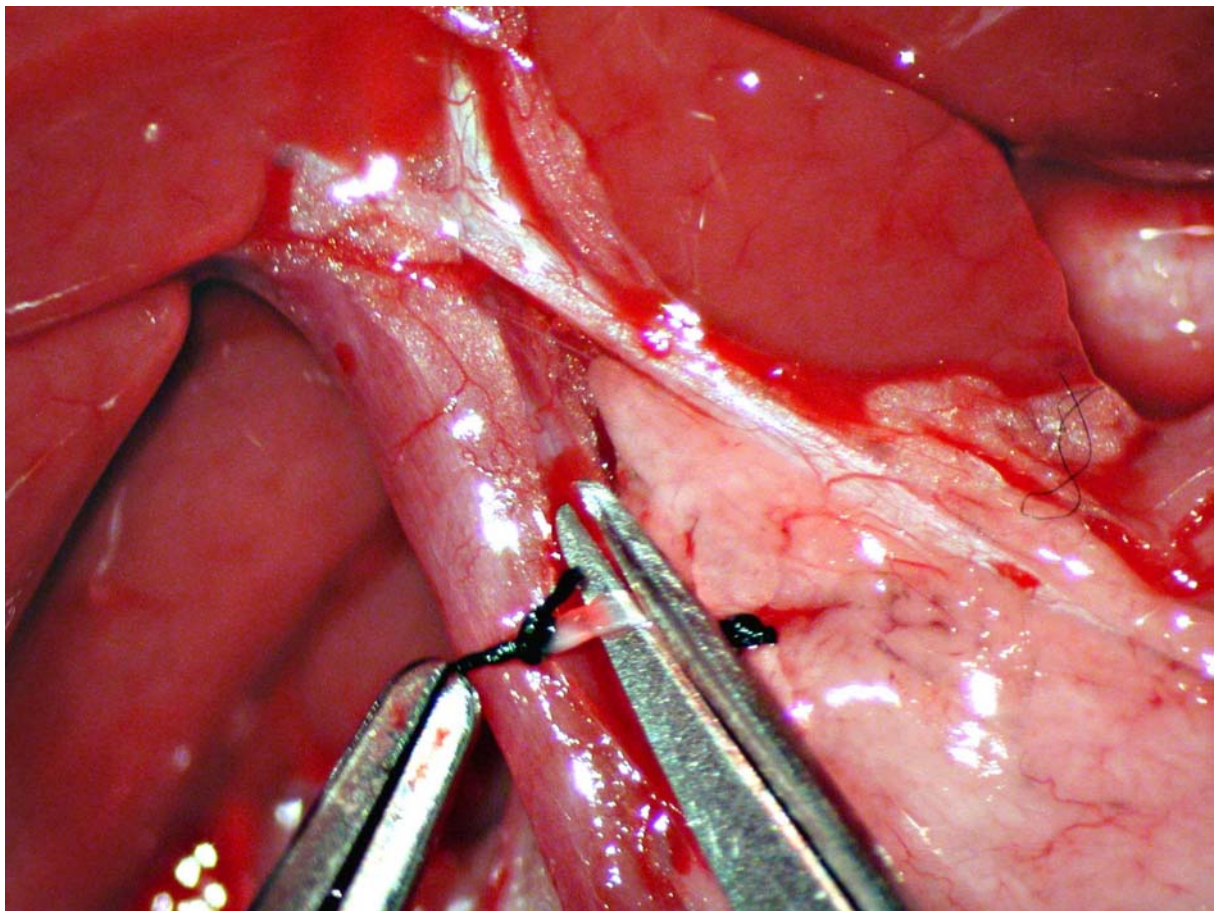


Abbildung 11: Durchtrennung der präpylorischen Vene, die in die Vena portae mündet. Rechts davon der Gallengang mit umgebenden, Pankreasgewebe.

Anschließend wurde die Pfortader in Höhe der Einmündung der präpylorischen Vene unterfahren und leberwärts ca. 5 mm weit stumpf mobilisiert. Die A. hepatica communis wurde identifiziert und von der A. gastroduodenalis getrennt. Nach Ligatur und Durchtrennung der A. gastrica sinistra und A. lienalis wurde der Truncus coeliacus bis zum aortalen Ursprung freigelegt. Der D. choledochus wurde mittels einer am Pankreasoberrand gelegten Ligatur angespannt, so daß nach leichter Dilatation des Ganges durch den

kontinuierlichen Gallefluß ca.1 cm distal der Gallengangsgabel eine die halbe Zirkumferenz des Ganges umfassende Inzision angelegt werden konnte. In diese Öffnung wurde ein ca. 6 mm langer, an beiden Seiten schräg angeschnittener Polyäthylensplint auf halber Länge eingeführt und mit einer 6-0 Seidenligatur eingebunden. Der Splint wurde aus einem dünnen Venenkatheter (22G) zurechtgeschnitten. Damit waren alle präparatorischen Vorbereitungen zur Leberperfusion getroffen.

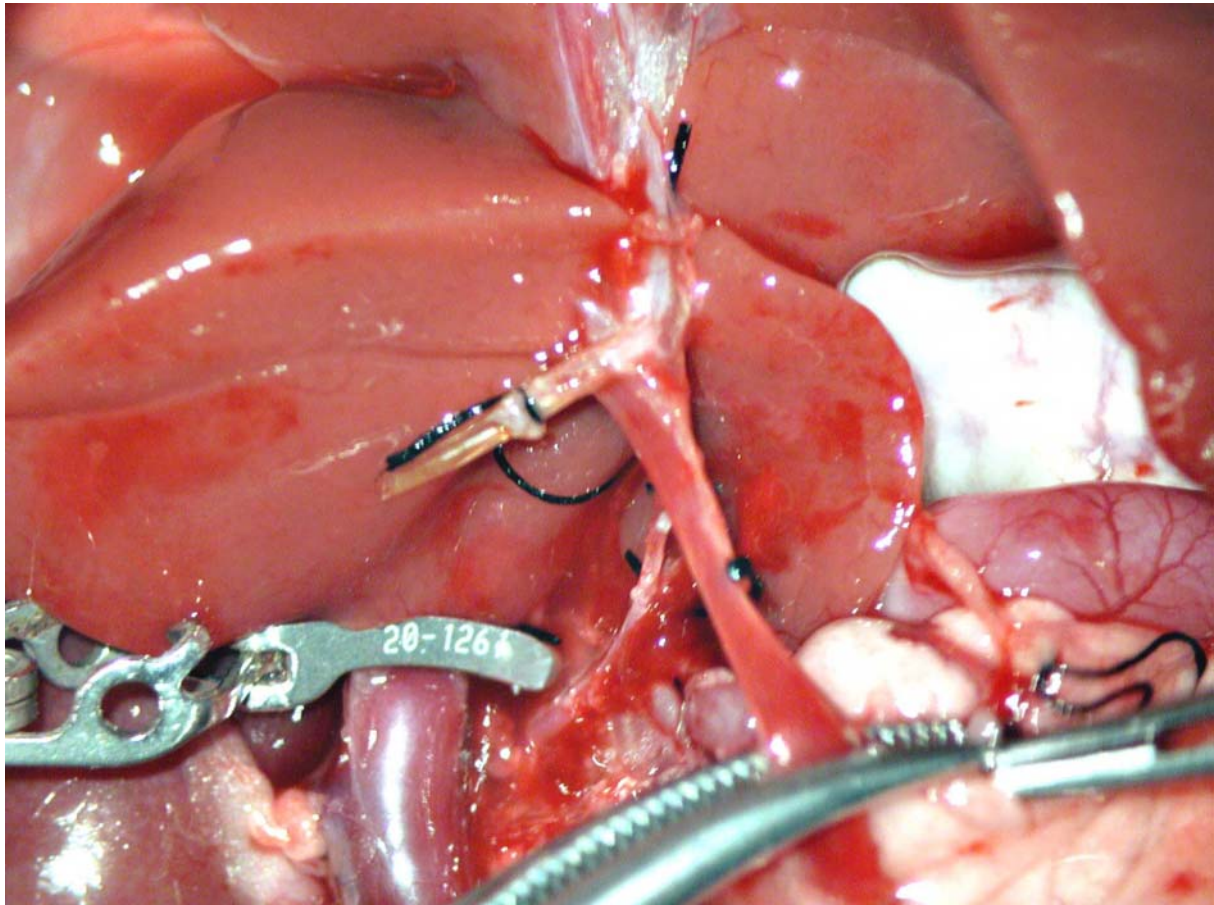


Abbildung 12: *Explantat unmittelbar vor portaler Perfusion mit kalter physiologischer Kochsalzlösung und Einlage eines Stents in den Gallengang. Die Pfortader und die infrahepatische Vena cava sind mit Klemmen verschlossen.*

Mittels Schwerkraftperfusion von 25 cm Wassersäule wurde über ein Standardinfusionsset und die eingelegte Kanüle die Leber mit 4° C kalter, 0.9%-iger NaCl-Lösung zunächst mit langsamer Tropfgeschwindigkeit perfundiert. Bei laufender Pfortaderperfusion wurde der Truncus coeliacus mit einem kleinen Patch von der Aorta abgesetzt und mit einem 24 G Venenkatheter, der auf eine 10 ml Spritze gesetzt war, manuell mit 4° C kalter NaCl-Lösung perfundiert. Das Perfusionsvolumen betrug portal 30 und arteriell 2 ml NaCl-Lösung. Nach

Abschluß der Perfusion wurde die Pfortader dicht oberhalb der Klemme durchtrennt, die rechte Nebennierenvene derart durchtrennt, daß die zuvor gelegte Ligatur am Transplantat verblieb. Die suprahepatische Vena cava wurde dicht am Übergang zum Zwerchfell abgesetzt. Somit war die Hepatektomie beendet, und das Transplantat konnte in eine mit 4° C kalter NaCl-Lösung gefüllte, auf Eis stehende Schale gelegt werden. Zum Abschluß wurden zwei 7-0 Prolene Eckfäden an der suprahepatischen Vena cava vorgelegt und mit einem Knoten fixiert, um beim Empfänger die Anastomosierungszeit und damit die anhepatische Zeit möglichst kurz zu halten.

D.3 Empfängeroperation

Der Zugang beim Empfängertier war eine mediane Laparotomie vom Xyphoid bis zur Blase. Die Mobilisierung der Leber glich in wesentlichen Zügen dem Vorgehen bei der Spenderoperation. Im Leberhilus wurde nach Absetzen der präpylorischen Vene die Pfortader bis zur Gabelung mobilisiert. Die A. hepatica propria und die A. gastroduodenalis wurden jeweils wenige Millimeter nach ihrem Abgang aus der A. hepatica communis ligiert und durchtrennt, so daß die A. hepatica communis als pulsierender Gefäßstumpf stehenblieb. Der Gallengang wurde unmittelbar an seiner Gabelung abgesetzt. Damit war der Situs zur Ausklemmung der nativen Empfängerleber und Implantation des Transplantates vorbereitet. Die Ausklemmung der Leber erfolgte nun durch eine Satinsky-Klemme suprahepatisch unter Mitnahme eines schmalen Zwerchfellsaums, dann durch kleine Gefäßklemmen an Pfortader und der infrahepatischen Vena cava. Die Leber wurde an den entsprechenden Gefäßen lebernah herausgetrennt und das anhepatische Tier um 180° gedreht, so daß der Kopf des Tieres auf den Operateur zeigte. Während der anhepatischen Phase reagierte die Ratte sehr sensibel auf das Anästhetikum bei stark reduziertem Herzminutenvolumen, so daß die Inhalationsnarkose während dieser Operationsphase stark vermindert bzw. ganz ausgesetzt werden konnte, ohne Gefahr zu laufen, daß das Tier aufwacht. Das Transplantat wurde anatomiegerecht im Situs plziert. Als erste Anastomose wurde die suprahepatische Vena cava genäht. Vor der Knotung des letzten Eckfadens wurde das Gefäßlumen mit physiologischer Kochsalzlösung über eine stumpfe Kanüle gefüllt, um ein Verbleiben von Luftblasen und eine potentiell letale Luftembolie nach Blutstromfreigabe auszuschließen. Anschließend wurde das Tier wieder in die Ausgangslage gedreht und der Pfortaderstumpf am Transplantat identifiziert. Die Pfortadernaht erfolgt mit Prolene 8-0. Zur Freigabe des portalen Blutstroms wurde das obere Abdomen mit körperwarmer Kochsalzlösung gefüllt, um nach Lösung der Satinsky-Klemme von der suprahepatischen Vena cava Luftembolien durch

noch nicht geronnene Stichkanäle zu vermeiden. Bei diesem Vorgehen betrug die anhepatische Zeit im Schnitt 15 min. (*Abb. 13*). Als nächstes wurde die infrahepatische Vena cava in gleicher Weise wie die Pfortader fortlaufend mit 8-0 Prolene anastomosiert. Nach Freigabe des Blutstromes, hier mit Rückfluß des gestauten Blutes aus der unteren Körperhälfte, kam es zu einem Anstieg des Herzminutenvolumens, was an einer verbesserten Perfusion der Eingeweide sichtbar war.

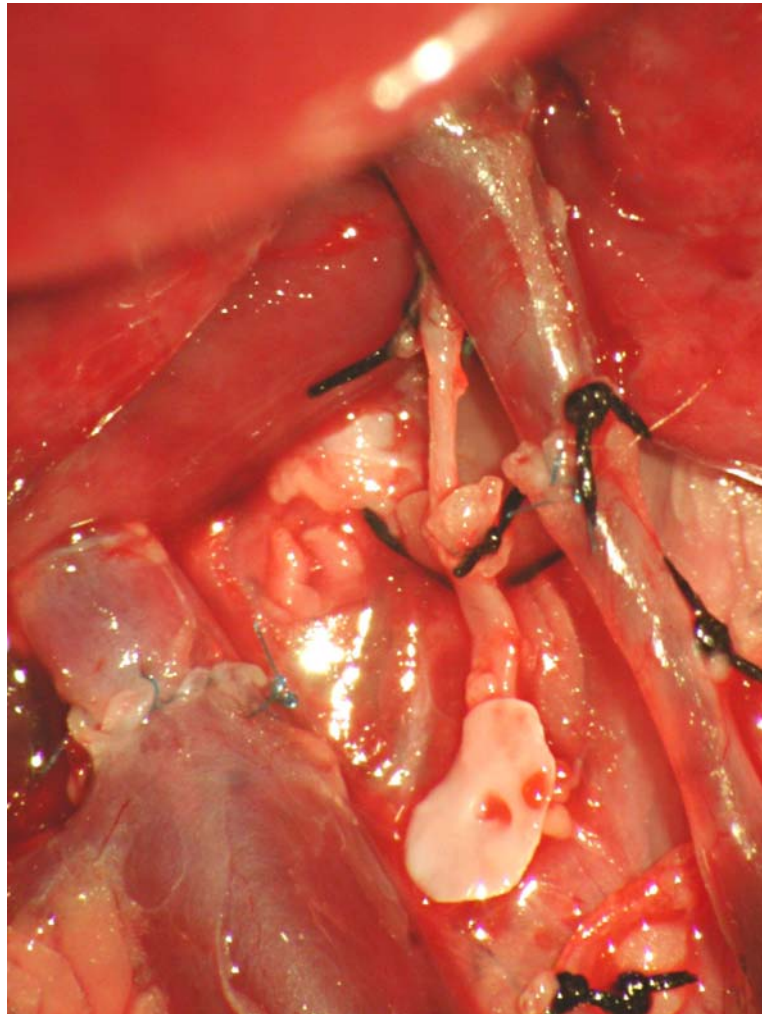


Abbildung 13: *Anastomosierte infrahepatische Vena cava und Pfortader mit gut perfundiertem Transplantat. Der Arterienpatch ist für die Rekonstruktion vorbereitet.*

Nun erfolgte der arterielle Wiederanschluß. Die zuvor freigelegte A. hepatica communis wurde an ihrer Basis mit einem Mikroclip geklemmt, in den Stumpf ein 24G Venenkatheter (Terumo) eingebracht und mit einer Ligatur fixiert. Anschließend wurde der Truncus coeliacus des Spenders über den Cuff gezogen und mit einer 6-0 Nylonligatur gegen ein Abrutschen gesichert. Nach Entfernung des Mikroclips an der Arterienbasis kam es zu einer

sofortigen, deutlich sichtbaren Pulsation der supraanastomotischen Arterie und ihrer ersten Aufzweigungen im Leberhilus. Die Gallengangsanastomose erfolgte in der Technik nach Zimmermann (Zimmermann et al. 1979).

Dafür wurde eine 8-0 Nylonnaht durch den freien Rand des Spendergallenganges distal der Sicherungsligatur für den Splint geführt. Der Splint wurde dann in den empfängerseitigen Ductus choledochus eingeführt und beide Ränder mit zwei 8-0 Einzelknopfnähten verbunden.

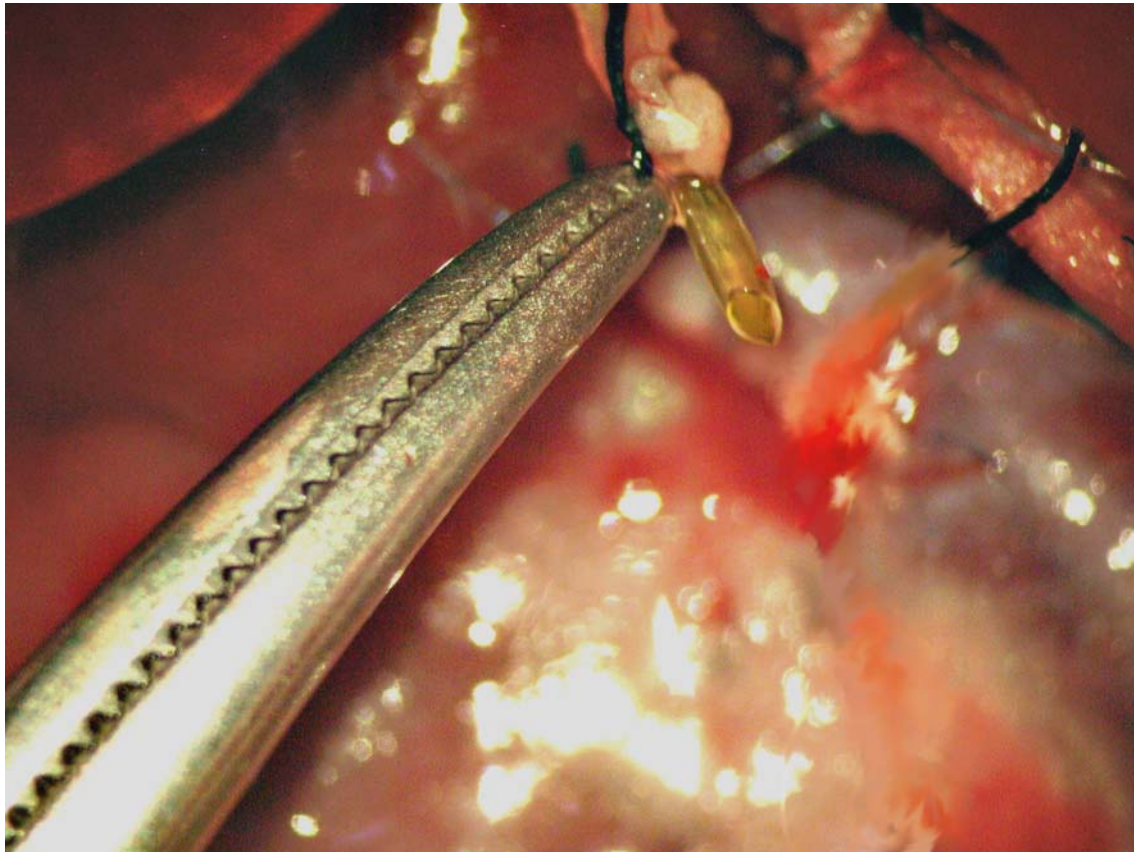


Abbildung 14: Nach Reperfusion ist die beginnende Galleproduktion ein Zeichen der sofortigen Funktionsaufnahme des Transplantates.

Nach abschließender Inspektion des Abdomens und Spülung mit warmer Kochsalzlösung erhielten die Tiere 1-2 ml Kochsalzlösung i.v. zur Volumenunterstützung. Die Bauchwand und die Haut wurden mit 3-0 absorbierbarem Nahtmaterial (Dexon) fortlaufend verschlossen. Postoperativ wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt, bis sie nach dem Erwachen in Einzelhaltungskäfige gesetzt wurden. Postoperativ hatten alle Tiere Zugang zu Wasser und Futter ad libitum.

E. Histologische und molekularbiologische Untersuchungen

E.1 Probengewinnung

Für die feingewebliche Aufarbeitung von Gewebeproben der Tiere wurden an den entsprechenden postoperativen Tagen nach Ausbluten der Tiere Proben von Leber, Milz, mesenterialen Lymphknoten und Thymus in einem standardisiertem Verfahren entnommen und in Formalin (10%, wässrig, gepuffert) fixiert. Das Ausbluten der Tiere erfolgte in Narkose mit einem Katheter (Terumo 24 G) in der infrarenalen Aorta. Der Rest des Materials wurde sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

E.2 Isolierung von RNA und Protein

E.2.1 Materialien

30 % Acrylamid/Bisacrylamid von Biorad: 37,5:1 (2,6 %) -Stammlösung	1 % Ethidiumbromid-Stammlösung: 0,01 g Ethidiumbromid ad 10 ml Aqua bidest
10 % Ammoniumpersulfat (APS): <i>100 mg APS ad 1 ml Aqua bidest.</i>	0,5 M EDTA-Stammlösung (pH 8,0) (Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure): 93,05 g EDTA x 2 H ₂ O zu 300 ml H ₂ O mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt ad 500 ml Aqua bidest
0,1 M Dithiothreitol von GibcoBRL	10 % Natriumdodecylsulfat (SDS): 10 g Natriumdodecylsulfat ad 100 ml Aqua bidest

E.2.1.1 Puffer

Laemmli-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1 % SDS	10 x Tris-Borat-Puffer (TBE; pH 8,3): 1 M Tris-Base 0,85 M Borsäure 0,01 M EDTA
10-fach PCR Puffer von Promega	1 M Tris-HCL (pH 6,8): 121,1 g Trizma Base in 800 ml H ₂ O mit HCl auf pH 6,8 eingestellt und auf 1 l mit Aqua bidest aufgefüllt
SDS Probenpuffer: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 10% (w/v) SDS 10% (v/v) Glyzerol 5% (v/v) 2-b-Mercaptoethanol 0,05% (w/v) Bromphenolblau	1,5 M Tris/HCl (pH 8,7): 181,7 g Trizma Base in 800 ml H ₂ O mit 1 M HCl auf pH 8,7 eingestellt und auf 1 l mit Aqua bidest aufgefüllt
1 x TBS-Puffer (tris buffered saline; pH 7,6): 20 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 137 mM NaCl	TTB-Puffer mit 0,1% TWEEN: TBS-Puffer 0,1% (v/v) Tween 20

E.2.1.2 Gele

X % Agarosegel: 1 x TAE-Puffer (pH 8,0) x% (w/v) Agarose	15 ml 8 % Trenngel: 3,75 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,7) 4,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30:0.8 75 µl 10 % SDS-Lösung 150 µl 10 % APS 1 µl TEMED 1,175 ml Aqua dest.
5 ml 5 % Sammelgel: 1,25 ml 0,5 M Tris-HCL (pH 6,8) 835 µl Acrylamid/Bisacrylamid 30:0.8 25 µl 20 % SDS-Lösung 50 µl 10 % APS 5 µl TEMED 2,89 ml Aqua dest.	

E.2.1.3 Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid (30%) 37,5:1 (2,6%)	Biorad
Agarose	Biograd
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Azeton	Merck
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Desoxynukleotidtriphosphat	Boehringer
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure	GibcoBRL
Größenmarker, 100 bp-DNA	GibcoBRL
Hämatoxylin, Mayers	Merck
Hyperfilm ECL	Amersham
H ₂ O ₂ , 30%	Sigma-Aldrich
MgCl ₂ , 50 mM	GibcoBRL
MMLV-Reverse Transkriptase (200U/ml)	GibcoBRL
Nitrozellulosemembran 45 mm	Schleicher und Schuell
Protein-Standard SDS-7b	Sigma-Aldrich
Protein-Standard High Range	Biorad
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Rnasin (40U/ml)	Promega
Random Hexamer Oligonukleotide	Boehringer-Mannheim
Sodiumdodecylsulfate	Sigma-Aldrich
Taq DNA Polymerase	GibcoBRL
Trizma Base	GibcoBRL
TRIZOL-Reagenz	GibcoBRL 68
Tween 20	Roth
Whatmanpapier, 3MM	Schleicher und Schuell

E.2.2 Durchführung (Blumberg 1987)

Die Gesamt-RNA und die Proteinfraction wurden aus den präparierten Gewebeproben jeweils mit TRIZOL-Reagenz (GibcoBRL68) nach den Herstelleranweisungen extrahiert.

Das Reagenz besteht aus Phenol und Guanidinisoithiocyanat. Nach Homogenisierung des Gewebes im TRIZOL-Reagenz unter dem Abzug teilt sich das Reagenz nach Zugabe von Chloroform und anschließendem Zentrifugieren in eine wässrige Phase mit der RNA und in eine schwerere organische Phase, die unter anderem die Proteinfraction beinhaltet.

Aus der wässrigen Phase wurde RNA mittels Isopropanol präzipitiert, in 75%-igem Ethanol gewaschen und der Niederschlag (Pellet) in Rnase-freiem H₂O wieder aufgenommen. Das Zentrifugieren am Ende der Präzipitation wurde mit 12000 g für 15 min durchgeführt. Aus der schwereren organischen Phase wurde die Proteinfraction isoliert. Dabei wird nach Präzipitation der DNA der Proteinanteil mit Isopropanol ausgefällt und der Protein-Niederschlag mit Guanidinhydrochlorid gewaschen, zuletzt in Ethanol aufgenommen und nach Vakuumtrocknung in 1%-igem SDS-Puffer gelöst. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei –80°C gelagert.

E.2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Gelelektrophorese

RNA besitzt wie DNA ein Absorptionsmaximum im UV-Spektrum bei einer Wellenlänge von 260 nm, während das durch Proteine verunreinigte Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt. So kann der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm als Qualitätskontrolle verwendet werden und sollte bei nach TRIZOL isolierter RNA größer 1,6 liegen. Proben mit kleineren Extinktionswerten als 1,6 wurden als mit Proteinen verunreinigt angesehen und nochmals mit 75% Ethanol gewaschen. Wenn der Quotient nach der erneuten Reinigung noch immer unterhalb von 1,6 lag, wurde die Probe verworfen. Die Absorption bei 260 nm korreliert mit der RNA-Konzentration und wurde zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt.

Durchführung:

4 µl der isolierten RNA-Lösung wurden in 196 µl Aqua bidest verdünnt und im Photometer (UV-VIS 1202; Shimadzu) die Extinktion bei 260/280 nm gemessen. Bei einem Quotienten größer 1,6 wurde die RNA-Konzentration berechnet (eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml). Nach dem Ergebnis wurden die Proben auf eine gemeinsame Konzentration von 1 µg/µl verdünnt.

Da bei der photometrischen Messung weder DNA-Kontamination noch Degradation der RNA erkannt werden, wurden jeweils 5 µg der isolierten RNA auf ein 2 %-iges Agarosegel

aufgetragen. Nach der Elektrophorese bei 80 mV wurde das Gel mit 0,1 % Ethidiumbromid gefärbt und die RNA mit ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Die RNA-Qualität ließ sich nun anhand der intakten 18 s und 28 s Banden beurteilen.

E.2.4 Reverse Transkription und DNase-Verdau

Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit Desoxyribonuclease I behandelt (einem einzel- und doppelsträngigen DNA abbauenden Enzym). Hierbei wurde pro Ansatz 1 µg RNA mit 1 µl 10x DNase I Reaction Buffer und 1 U DNase I in 7 µl Aqua bidest für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 25 mM EDTA.

Zur semiquantitativen Untersuchung der mRNA-Expression muss mit Hilfe des Retroviren-Enzyms Reverse Transkriptase aus der isolierten Gesamt-RNA von jedem vorhandenen mRNA-Molekül der komplementäre DNA-Strang synthetisiert werden. An der komplementären DNA (cDNA) wird dann im nächsten Schritt die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Hierzu wurde in einem Gesamtansatz von 10 µl 1 µl einer 0,1 µg/µl konzentrierten RNA-Lösung eingesetzt. Danach wurden 2 µl 10-fach PCR-Puffer, 1 µl Random Hexamer Oligonukleotide (0,1 mM), 0,5 mM Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs), Aqua bidest, 1,1 µl Dithiothreitol (100 mM), 0,5 µl Rnasin (40 U/µl) hinzugefügt und bei 21°C für 10 min, gefolgt von 37°C für 1 h und 95°C für 5 min in einem PCR-Thermocycler (Biometra) inkubiert.

Kontrollreaktionen zur Identifizierung von DNA-Kontamination bzw. falsch positiven Banden wurden durchgeführt, indem Proben ohne Reverse Transkriptase [(-)-RT] bzw. Aqua bidest bei der RT-PCR eingesetzt wurden.

E.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode ermöglicht den Nachweis kleinster Mengen von bestimmten DNA-Abschnitten durch gezielte exponentielle Vervielfältigung dieser DNA-Fragmente. Das Prinzip besteht in der zyklischen Wiederholung (25-40x) der folgenden drei Einzelschritte:

1. Denaturierung:

Die DNA-Doppelstränge zerfallen bei 95°C in die beiden komplementären Einzelstränge.

2. Ankopplung („Annealing“):

cDNA-spezifische Oligonukleotide („Primer“) lagern sich an die komplementäre cDNA an.

3. Verlängerung ("Elongation"):

Verlängerung des Primer/cDNA-Hybrids vom 3'-Ende her durch eine DNA-Polymerase. Die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* ("Taq-Polymerase") ermöglicht die automatisierte Wiederholung dieser drei Einzelschritte in einem Thermocycler, ohne jeweils nach dem Denaturieren wieder neues Enzym zusetzen zu müssen.

Mit jedem Durchlauf dieser drei Schritte verdoppelt sich theoretisch die Anzahl der Genfragmente, wenn die Reaktionseffizienz der PCR bei eins läge.

Die Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wird an Hand der publizierten Sequenzen des Zielgens ausgewählt. Dabei gilt ein hoher Prozentsatz an GC-Basenpaarung zwischen Primer und dem komplementären cDNA-Fragment wegen der größeren Anzahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen als günstig.

E.3.1 Oligonukleotide (Primer)

Die Sequenzen und Länge der amplifizierten PCR Produkte betragen:

β-actin

down	5`CTG AAC CCT AAG GCC AAC-3`	
up	5`CGG AAC CGC TCA TTG CC-3`	440bp

Interleukin-2

down	5`-TGG CTC ATC ATC GAA TTG GC-3`	
up	5`-CAG CTG TTG CTG GAC TTA C-3`	291 bp

Interleukin-4

down	5`-CAA GTA TTT CCC TCG TAG GAT GC-3`	
up	5`-GCA CCG AGA TGT TTG TAC CAG-3`	309 bp

Interleukin-10

down	5`GCA ACC CAA GTA ACC CTT AAA GTC-3`	
up	5`TGG AGT GAA GAC CAG CAA AGG C-3`	196 bp

IL-12 beta 2

down	5`ACA GCT GCT GGT GAA AGT C-3`	
up	5`TAA CCT TGG AAC CCT TG-3`	398 bp

Interferon-γ

down	5`GAG TGC TAC ACG CCG CGT CTT-3`	
up	5`TCA TTG ACA GCT TTG TGC TGG-3`	338 bp

Das β -Actin Primer-Paar überspannt ein Intron und müsste daher in der Lage sein, Kontaminationen mit der DNA aufzudecken. Tatsächlich kommt es auf Grund von mRNA-komplementären Abschnitten in der genomischen DNA („Pseudogenen“) zur Amplifikation von Amplifikaten identischer Größe, die mit der Messung der mRNA konkurrieren und damit das Ergebnis nach unten verfälschen. Um Kontamination der (–)-RT Probe mit genomischer DNA entgegenzutreten, wurde die oben erwähnte Behandlung der präparierten RNA mit Desoxyribonuclease I etabliert.

E.3.2 Durchführung der PCR

Die PCR wurde in Reaktionsansätzen von 50 μ l durchgeführt. Darin enthalten war 5 μ l PCR Puffer, 3 μ l MgCl (25mM), 0,3 μ l dNTP (jeweils 25mM) 1,5 μ l des Primer I (sense), 1,5 μ l des Primer II (antisense) und 34,7 μ l steriles Wasser.

Diese Bestandteile wurden für die Gesamtanzahl der untersuchten Proben in ein 5 ml großes Reaktionsgefäß (Master-Mix) pipettiert, geschüttelt und auf die einzelnen Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese im Ethidiumbromid-gefärbtem, 2%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden nach Anregung im UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Geldokumentationssystem 5000, Geldokumentationssystem mit Diana Software, Firma Raytest). Als molekularer Massenstandard wurden 100 bp-DNA-Größenmarker verwendet. 10 μ l Aliquots jeder cDNA-Probe wurden so verdünnt, daß die Bandenstärke der β -Actin-PCR in allen Proben gleich war. Die Expression der Zielgene wurden semiquantitativ als nicht exprimiert (-), schwach (x), mittel (xx) oder stark (xxx) klassifiziert. In den durchgeführten Experimenten wurde diese Technik der RNA-Quantifizierung gewählt, da die Bestimmung der mRNA-Expressionshöhe als relativer Wert zu den Kontrollen ausreichend war und eine absolute Konzentrationsangabe der mRNA eines Zielgenes keine zusätzlichen Informationen erbracht hätte. In den durchgeführten Validierungsexperimenten durch den Einsatz von Proben mit definierter RNA-Konzentration erwies sich die angewandte semiquantitative RT-PCR als geeignete Methode, große und mittlere Unterschiede in einer mRNA-Konzentration eines Zielgenes reproduzierbar zu bestimmen. Die Methode ließ sich unkompliziert auf ein neues Primer-Paar übertragen.

E.4 Proteinchemische Methoden

E.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung in Probenhomogenaten

Die kolorimetrische Methode nach Bradford basiert auf dem Prinzip, daß Coomassie Blau in saurer Alkohollösung unter Anwesenheit von Protein einen blauen Protein-Farbreagenz-Komplex ausbildet. Diese Blaufärbung läßt sich mit einem Photometer bei 595 nm messen und ist direkt proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung.

Aus den Proben wird neben der RNA-Fraktion auch die Proteinfraction isoliert. Während die Proben auf Eis auftauten, wurde die Stammlösung von 20 mg/ml bovinem Serumalbumin mit Aqua dest. zu einer Standardreihe verdünnt, welche die Konzentrationen von 5 µg/ml bis 100 µg/ml umfasste. Die Proteinproben wurden 1:100 mit Aqua dest. verdünnt. 30 µl der einzelnen Verdünnungen sowie der Standards wurden jeweils zusammen mit 150 µl Bradford-Reagenz in Doppelbestimmungen auf eine 96-well-Platte pipettiert und nach einer 5-minütigen Inkubation im Photometer bei 595 nm gemessen. Anhand der Standardgeraden konnte die absolute Proteinkonzentration in den Proben errechnet werden.

E.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

E.4.2.1 Erstellung der Gele

Die elektrophoretische Auftrennung der isolierten Proteine erfolgte vertikal in einem denaturierenden Polyacrylamidgel in einer Mini-Protean II Dual Slab Cell Gelelektrophorese-Kammer (Biorad). Ein denaturierendes Elektrophorese-Gel einer Western-blot-Analyse besteht aus zwei Komponenten. Der Anfangsteil des Gels nimmt die Proben auf (Sammelgel) und besitzt durch eine geringere Konzentration an Acrylamid (5%-iges Sammelgel) geringere Trenneigenschaften als das Trenngel. Das Gesamtvolumen des Sammelgels von 5 ml bestand aus Acrylamid 825µl, 1,25 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)) 25µl 20% SDS und 2,89 ml H₂O. Die Konzentration des Trenngels betrug 8%. Das Gesamtvolumen betrug 15 ml, bestehend aus Acrylamid 4,0 ml, 3,75 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)) und 75µl 20% SDS. Mit 7,175 ml H₂O wurde dann auf 15 ml aufgefüllt. Zur Polymerisation des Gels wurden 150 µl 10 %-ige Ammoniumpersulfatlösung und 15 µl TEMED zugesetzt. Danach wurden die Gele mit 100 µl 0,1 % SDS überschichtet. Nachdem die Gele polymerisiert waren, wurde die SDS-Lösung mit einem Filterpapier entfernt.

E.4.2.2 Probenaufbereitung

Nach der Konzentrationsbestimmung wurden je 20 µg Protein mit reduzierendem SDS-Probenpuffer nach Laemmli im Verhältnis 1:1 verdünnt. Nachdem die Proben für 10 min auf 95°C erhitzt wurden, um die antigenen Strukturen freizulegen, erfolgte zunächst die Lagerung auf Eis für 2-3 min und anschließend das Einbringen der Proben in die Geltaschen des Elektrophorese-Gels.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 V (Sammelgel) bzw. 100 V (Trenngel) im Laemmli-Elektrophoresepuffer. Kurz bevor die Bromphenolblau-Lauffront den Gelboden erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Als molekularer Massenstandard wurden der gefärbte Protein-Standard SDS-7b und der gefärbte Protein-Standard High Range verwendet.

E.4.3 Western-blot-Analyse

E.4.3.1 Transfer der Proteine im halbtrockenen Verfahren (Semidry Blot)

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteinbanden vom Trenngel auf eine PVDF übertragen („geblottet“). Der Transfer erfolgte im halbtrockenen Verfahren mittels eines methanolhaltigen Transferpuffers ("Towbin-Puffer"). Dafür wurde die PVDF-Membran in 60%-iger Methanollösung für 5 min im vorinkubiert. Anschließend wurde das Trenngel vorsichtig mit Hilfe des Schaftes einer Glaspipette aufgenommen und zwischen fünf Lagen, inzwischen mit Transferpuffer getränktem 3MM Whatmanfilterpapier auf die Membran gelegt. Dieser Sandwich aus getränktem Filterpapier außen und Trenngel mit PVDF innen wurde einer Spannung durch die Platzierung zwischen zwei horizontalen Kohleelektroden (Fastblot System, Biometra) ausgesetzt. Einer Erwärmung der Elektroden wurde durch eine Wasserkühlung mit Leitungswasser für die Dauer des Blottings von ca. 3 h vorgebeugt.

E.4.3.2 Immundetektion der Proteine in den geblotteten Proteinbanden

Unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF wurden durch Inkubation der Membran in TBS-Puffer mit 5% Milchpulver für mindestens 2 Stunden blockiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min in TBS-Puffer mit 0,1 % Tween und dreimal 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper wurde bei 4°C über Nacht im Kühlraum durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde die Membran fünfmal für 5 min in TBS-Puffer mit 0,1 % Tween und dreimal 5 min in TBS-Puffer gewaschen und mit

dem entsprechenden anti-Maus IgG-Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 1-2 h inkubiert.

Anschließend wurde die Membran letztmalig dreimal für 5 min in TBS-Puffer mit 0,1 % Tween und dreimal 5 min in TBS-Puffer gewaschen.

Durch Behandlung der Membran mit dem *ECL-Regenz*® (Amersham) und Detektion der anschließenden entstehenden Chemilumineszenzstrahlung auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) wurde die Immunreaktivität aufgezeichnet.

E.4.3.3 Verwendeter Antikörper für den Western-blot

<i>Name</i>	<i>Spezies</i>	<i>Hersteller</i>
Primäre Antikörper		
PARP (AB-2)	Maus	Oncogene
Anti-mouse IgG ₁		

E.5 Histologische Techniken

E.5.1 Hämatoxilin-Eosin (H.E.)-Färbungen

Zur Untersuchung der morphologischen abstoßungsbedingten Organschäden wurden nach Paraffineinbettung der Lebern serielle Schnitte angefertigt und diese anschließend mit H.E. gefärbt.

Die H.E.-Färbung wurde durchgeführt, indem die Objektträger für 30 sek in einer Hämalalaun-Lösung und danach für 5 sek in einer Eosin-Lösung inkubiert wurden. Nach jedem Färbeschritt wurden die Objektträger vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen und abschließend die Objekte eingebettet. Die Auswertung erfolgte randomisiert und ohne Wissen um die experimentelle Gruppe.

E.5.2 Immunhistochemische Untersuchungen (APAAP-Methode)

Immunhistochemische Färbungen erlauben neben der Zelltypenidentifikation die detaillierte Phenotypisierung charakteristischer Zelloberflächenantigene, die mit den für sie spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAk) markiert und in einem zweiten Färbeschritt mit dem Sekundärantikörper beschichtet werden. Zur Festlegung der notwendigen Konzentration des Primärantikörpers wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Primärantikörper durchgeführt. Zur immunhistochemischen Beurteilung wurden von den Lebern Kryostatschnitte mit der Dicke von 5 µm angefertigt. Anschließend wurde die APAAP-Technik verwandt. Bei dieser Technik wird an das nachzuweisende Protein ein spezifischer Antikörper gebunden, der wiederum über einen sekundären Antikörper an einen Komplex aus Antikörper und Alkalische Phosphatase bindet. Die Enzymaktivität der alkalische Phosphatase wird ausgenutzt, indem mit einer chromogenen Substratlösung (Fuchsin) eine Farbreaktion ausgelöst wird. Die endogen vorhandene Aktivität von alkalischer Phosphatase wird durch 0,1% Levamisole blockiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte semiquantitativ: -, +, ++, +++ für keine, wenig, mittel und viel Farbtintensität an verschiedenen Strukturen wie Portalfelder und Sinusoide.

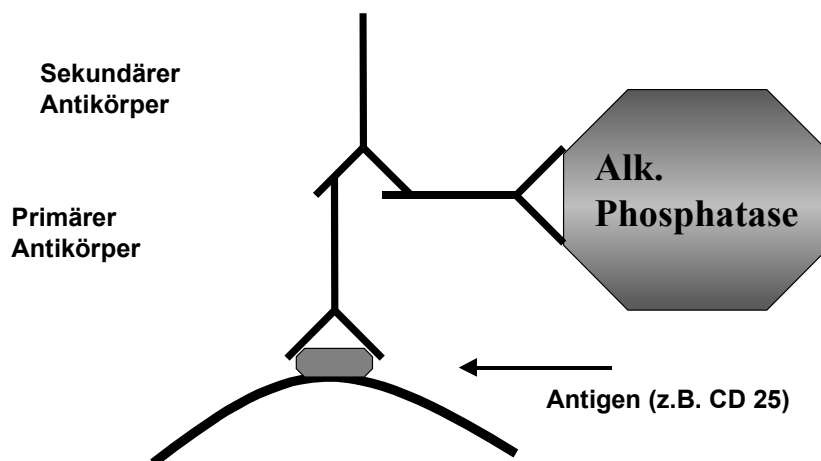


Abbildung 15: Ein primärer Maus-Antikörper bindet das Antigen. Über die Vermittlung eines sekundären Antikörpers wird ein APAAP-Komplex gebunden. Die Phosphatase-Aktivität wird nachfolgend in einer Farbreaktion genutzt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper

<i>Name</i>	<i>Spezies</i>	<i>Hersteller</i>
Primäre Antikörper		
Biotiniliertter Anti-rat RT1 A ^{a,b} Verdünnung 1:10	Ratte	Pharminingen
Monoklonaler Anti-mouse-CD25 Verdünnung 1:10	Maus	Serotec
Sekundäre Antikörper		
Anti-mouse IgG Verdünnung 1:500	Ziege	Dianova

E.5.3 In-situ-Apoptose-Detektion

Während der Apoptose degradieren spezifische Kalzium-abhängige Endonukleasen genomische DNA, aus der doppelsträngige DNA-Reste resultieren. Die Identifikation apoptotischer Zellen erfolgt durch die Detektion der DNA-Fragmente durch eine Kombination enzymologischer und immunhistochemischer Techniken (R&D Systems, TA4625, MN, USA). Kryostatschnitte der Leber mit einer Dicke von 6 µm wurden zunächst mit Formaldehyd 10 min fixiert. Um die DNA-Fragmente den färbenden Enzymen zugänglich zu machen, erfolgt die Permeabilisation mit Proteinase K-Verdau, welche für die Behandlung von Gewebeschnitten optimiert wurde. Endogene Peroxidase-Aktivität wird durch Hydrogen-Peroxid vermieden. Anschließend werden biotinilierte Nukleotide an die 3'-OH Enden der DNA-Fragmente mittels terminaler Desoxynukleotid-Transferase (TdT) inkorporiert. Die biotinilierten Nukleotide werden mit Streptavidin-Peroxidase Konjugaten identifiziert. Anschließend erfolgt die Gegenfärbung mit Methylgrün.

F. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das SPSS Software-Paket Version 10.0 (SPSS Corp., Birmingham, AL, USA) verwendet. Die Angabe von Daten erfolgt als Median. Bei Werten verbundener Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die Differenzen der Überlebenszeiten wurden mit Kaplan-Meier Kurven dargestellt und Unterschiede mit dem log-rank Test bestimmt (generalisierter Savage/Mantel Cox Test). Statistische Signifikanz wurde bei allen Untersuchungen bei einem p-Wert kleiner/gleich 0,05 akzeptiert.

IV. Ergebnisse:

A. Klinischer Verlauf nach orthotoper Rattenlebertransplantation

Unmittelbar postoperativ durchlaufen alle Empfängertiere eine Aufwachphase, die ca. 1-2 Stunden andauert. Anschließend fangen die Tiere sofort an, Flüssigkeiten zu sich zu nehmen. Das Verhalten unterscheidet sich im weiteren Verlauf nicht wesentlich von nicht-transplantierten Tieren. Bei Leberdysfunktionen im Rahmen von Abstoßungsepisoden entwickeln die Empfänger einen Ikterus, Gewichtsabnahme und bilden einen Buckel aus. Der Verlauf von Tieren mit guter Organfunktion entspricht dem nicht-transplantierten Ratten. Aufgrund des standardisierten Verfahrens mit kurzen Operationszeiten durch die Arterienrekonstruktion mit Stent lag die Quote technischer Fehler bei unter 5%.

B. Überleben und histologische Befunde

B.1 Vorversuch

Im Rahmen des Vorversuches erhielten lebertransplantierte Empfänger während der Transplantation intraportal und am 4. postoperativen Tag intravenös 2.5×10^8 spenderabgeleitete Lymphozyten. Dies führte nach 10 (Spannweite 6-12) Tagen im Median zu keiner Verbesserung des Überlebens im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe (*Tabelle 6, Abbildung 16*). Alle Tiere verstarben im Rahmen einer 3.-gradigen Abstoßung an einer Leberinsuffizienz mit Ikterus, Splenomegalie und gastrointestinalen Blutungen.

Tabelle 6: Überlebenszeiten von lebertransplantierten (DA \Rightarrow Lewis) Ratten mit zusätzlicher Applikation von spenderabgeleiteten Splenozyten während der Transplantation und 4 Tage danach.

Gruppe	n	Überleben	Median
Vorversuch	6	6,8,10,10,11,12	10

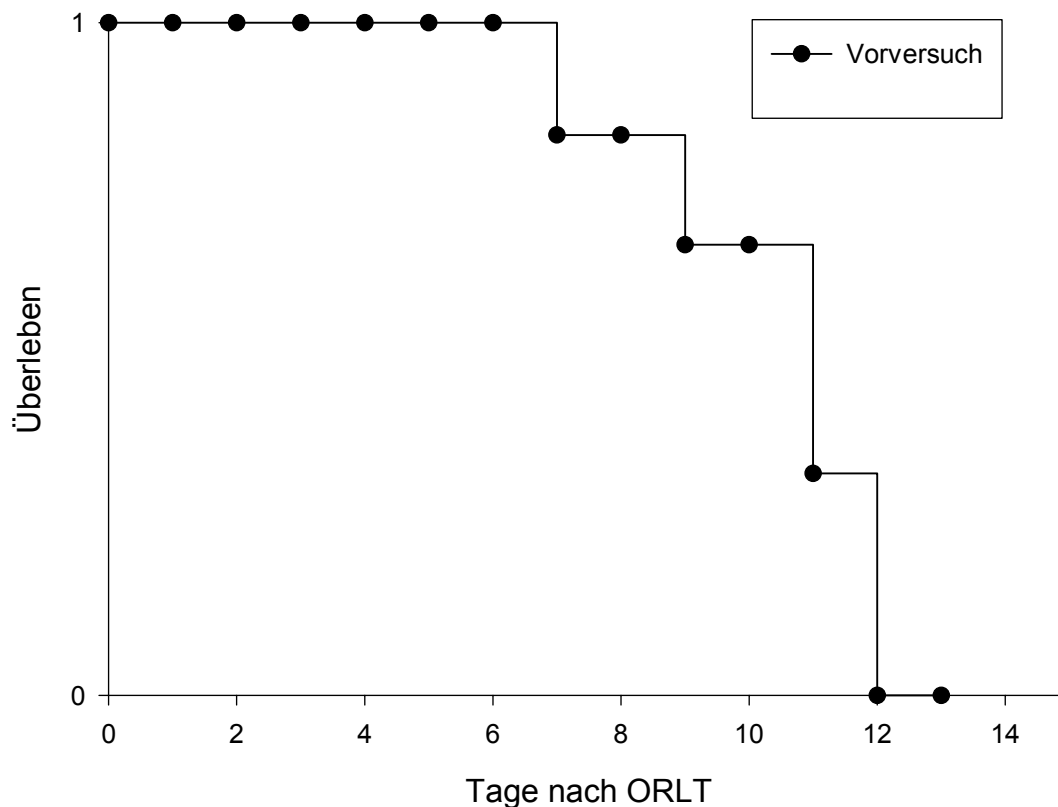


Abbildung 16: Überlebenskurve der allogenen lebertransplantierten Ratten, die während der Transplantation und einmalig am 4. postoperativen Tag Splenozyten erhielten.

B.2 Hauptversuch

B.2.1 Präkonditionierung der ORLT Empfänger (Hauptgruppe 1)

Empfänger, die vor der ORLT ausschließlich BN-Splenozyten erhalten hatten, zeigten mit einem Median von 11 Tagen und einer Spannweite von 9-12 Tagen kein verbessertes Überleben. Im Gegensatz dazu verlängerte sich das Überleben nach DA-Splenozyten-Vorbehandlung auf 18 Tage im Median ($p < 0.05$). Sehr viel effizienter war die Behandlung mit CTLA-4Ig präoperativ, die das mediane Überleben auf 150 Tage (Spannweite 14-150 Tage) verbesserte, wobei 3 Ratten vorzeitig verstarben. Statistisch nicht signifikant unterschiedlich war die zusätzliche Behandlung mit BN-Splenozyten und CTLA-4Ig, bei der wir ebenfalls ein medianes Überleben von 150 (Spannweite 14-150 Tage) Tagen beobachteten. Auch in dieser Gruppe starben 3 Ratten vorzeitig im Rahmen von Abstoßungsepisoden. In der mit DA-Splenozyten spenderabgeleiteten transfundierten Gruppe

und CTLA-4Ig-Behandlung überlebten alle Tiere mehr als 150 Tage die Transplantation. Diese Ergebnisse waren, verglichen mit der alleinigen CTLA-4Ig-Therapie und der Kombination BN-Splenozyten und CTLA-4Ig aufgrund der zu niedrigen Tierzahl nicht signifikant ($P=0.1$) (Tabelle 7, Abbildung 17).

Tabelle 7: Überleben nach Vorbehandlung mit Splenozyten und/oder CTLA-4Ig vor der ORLT. Alle vorzeitig verstorbenen Tiere verstarben im Rahmen der Leberinsuffizienz.

Gruppe	n	Therapie*	Überleben	Median
1.1	7	DA-Zellen	10,15,15,18,20,21,90	18
1.2	7	BN-Zellen	9,10,10,11,12,12,12	11
1.3	7	CTLA-4Ig	14,16,16,4 >150	150
1.4	7	DA-Zellen+CTLA-4Ig	7 >150	150
1.5	7	BN-Zellen+CTLA-4Ig	14,17,84,4 > 150	150

* Die Therapie mit spenderabgeleiteten DA- oder nicht spenderabgeleiteten BN- Zellen erfolgte in einer Konzentration von $2,5 \times 10^8$ Zellen an den Tagen -7 und -2 vor der Transplantation. CTLA-4Ig wurde den Tieren insgesamt viermalig an den Tagen -8,-7,-3,-2 vor der Transplantation appliziert.

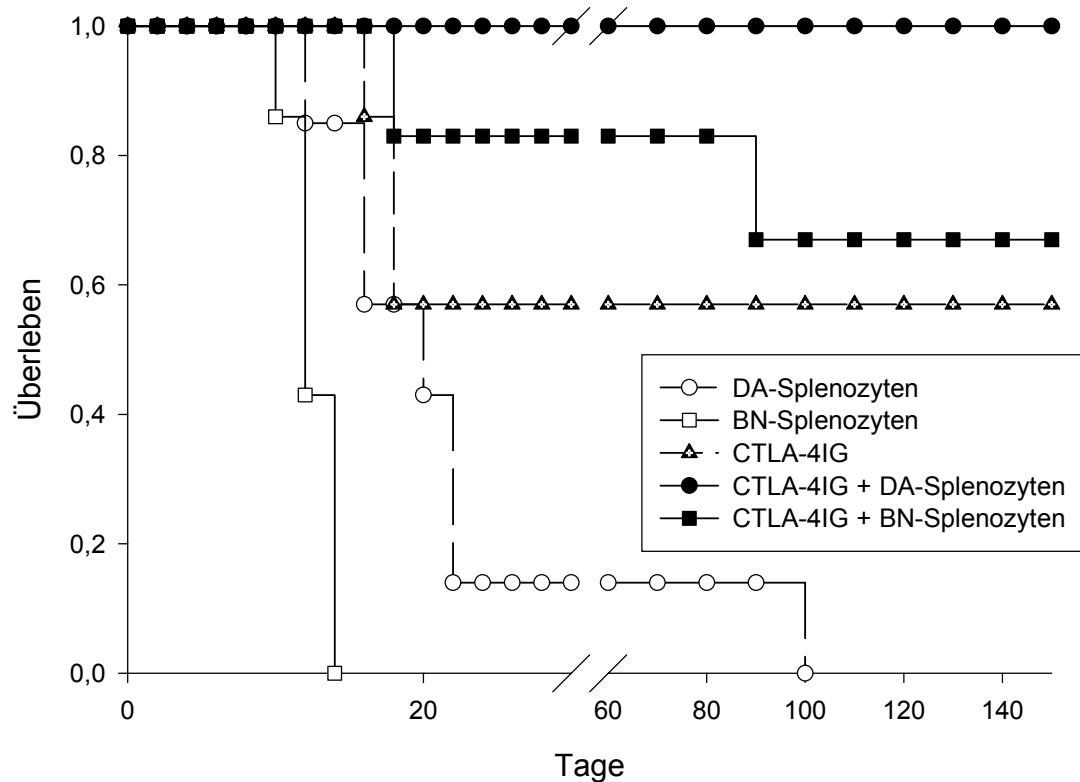


Abbildung 17: Überlebenszeiten nach allogener ORLT in Abhängigkeit von der jeweiligen Therapie vor der Transplantation.

B.2.1.1 Histologische Veränderungen

Die Tiere zeigten in allen Gruppen am 6. postoperativen Tag ein starkes periportales Infiltrat mit Beteiligung der Sinusoide. In den Gruppen 1.1 und 1.2 führt dies zu einer Abstoßung 3. Grades mit konfluierenden Nekrosen der Hepatozyten mit Gallenwegsproliferationen. In den Gruppen 1.3-1.5 trat dieses Bild nicht auf. Tiere, die ausschließlich mit CTLA-4Ig oder CTLA-4Ig und BN-Splenozyten vorbehandelt wurden, zeigten im Langzeitverlauf trotz guter Überlebensdaten Gallenwegsproliferationen und mononukleäre Infiltrate im Sinne chronischer immunologischer Veränderungen, die bei spenderspezifisch mit DA-Splenozyten und CTLA-4Ig vorbehandelten Tieren nicht auftraten.

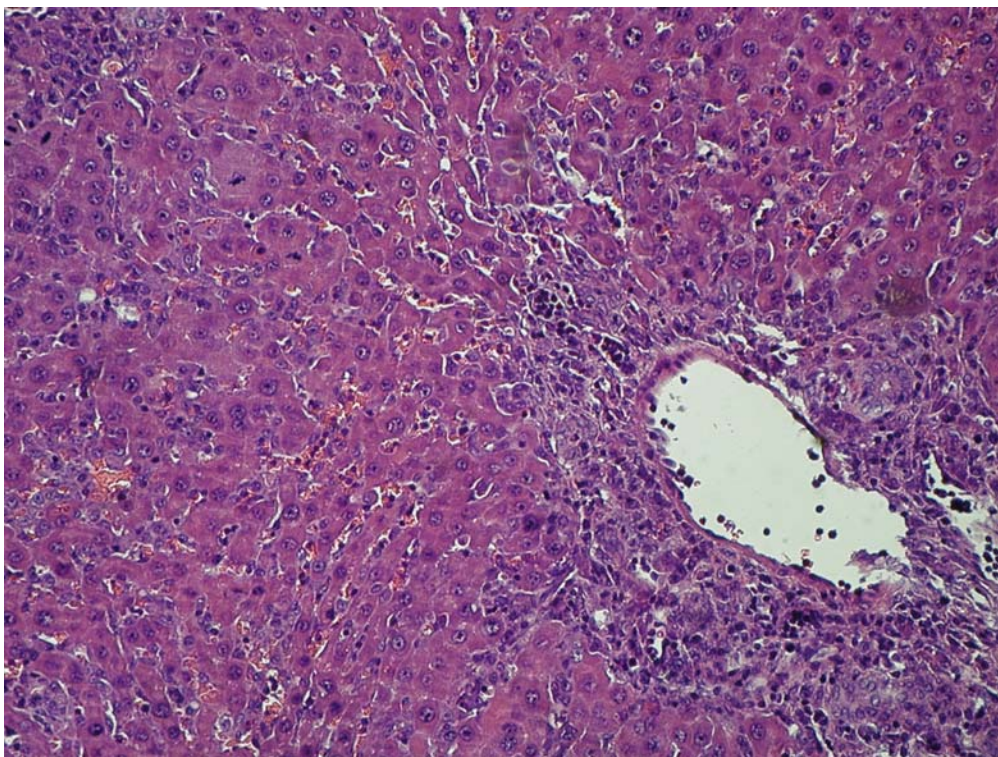


Abbildung 18: (H.E. Färbung, x20) Histologie der Leber eines Tieres nach allogener ORLT der Gruppe 1.1 mit DA-Splenozyten-Vorbehandlung, das nach 12 Tagen eine Abstoßung mit konfluierenden Nekrosen aufwies.

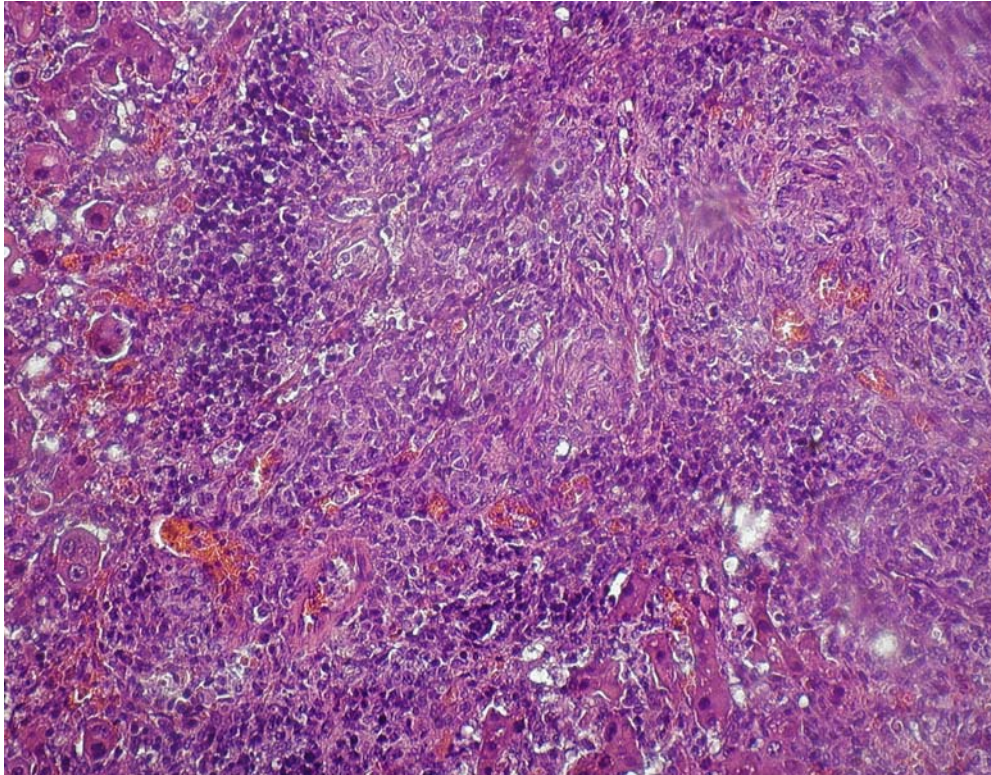


Abbildung 19: (H.E. Färbung,x20) Histologie der Leber eines Tieres nach allogener ORLT der Gruppe 1.2 mit BN-Splenozyten-Vorbehandlung, das nach 12 Tagen eine Abstoßung mit konfluierenden Nekrosen aufwies.

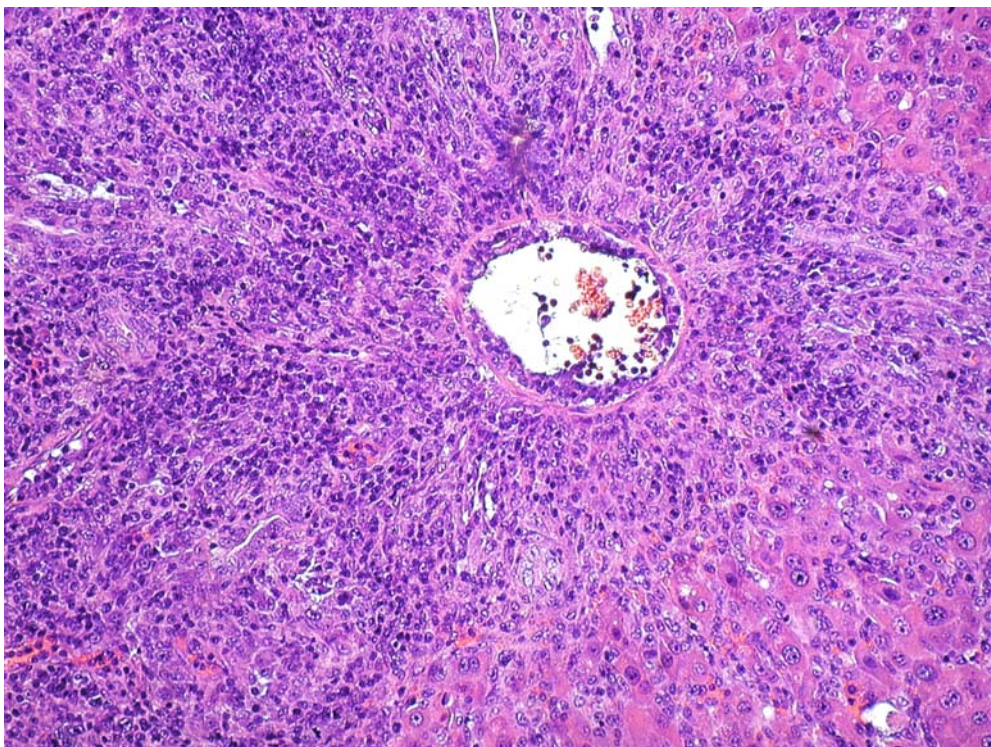


Abbildung 20: (H.E. Färbung,x20) Histologie der Leber eines Tieres der Gruppe 1.3 am 12. POD nach ORLT mit CTLA-4Ig-Vorbehandlung. Ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat mit vielen nekrotischen Hepatozyten .

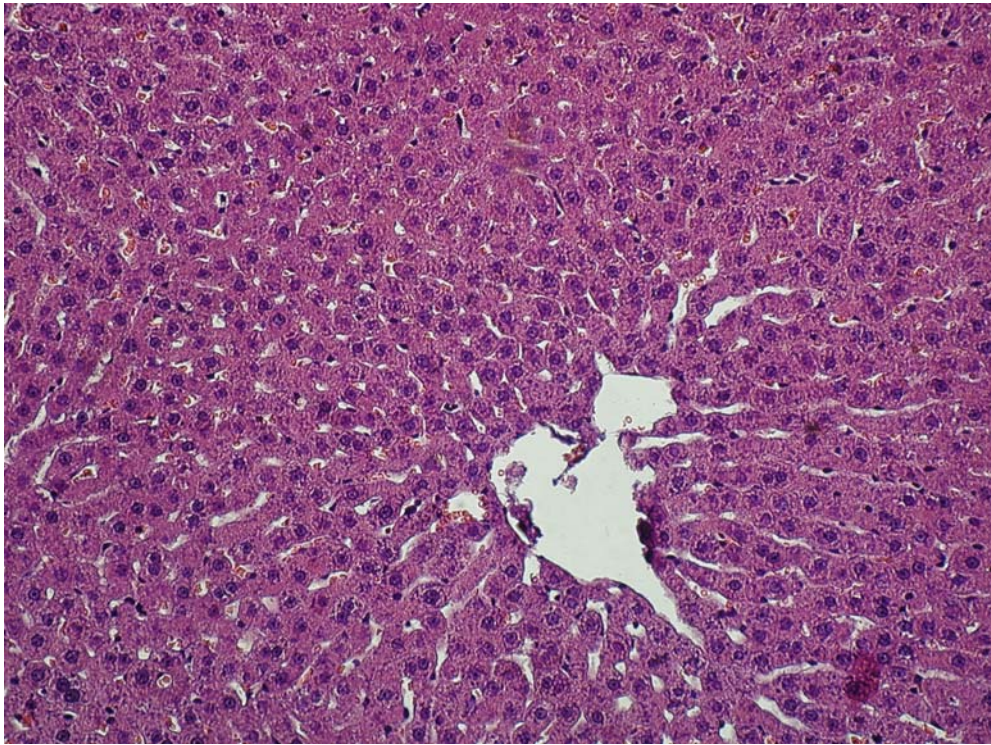


Abbildung 21: (H.E. Färbung, x20) Histologie der Leber eines Tieres der Gruppe 1.4 mit DA-Splenozyten-Vorbehandlung und CTLA-4Ig vor allogener ORLT und unauffälligem Lebergewebe nach 150 Tagen.

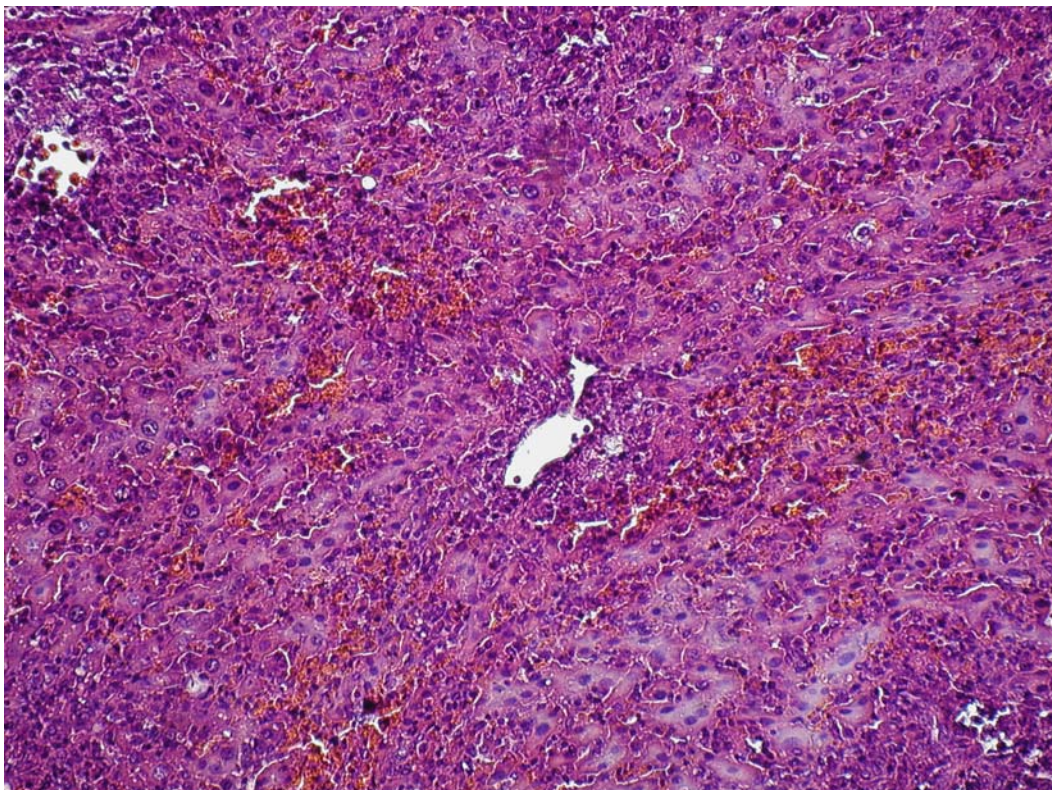


Abbildung 22: (H.E. Färbung, x20) Histologie der Leber eines Tieres nach 150 Tagen nach BN-Splenozyten- und CTLA-4Ig (Gruppe 1.5) -Behandlung vor allogener ORLT mit Gallenwegsproliferationen, mononukleären Infiltraten und Hyperämie.

B.2.2 Hauptgruppe 2

Die Hauptgruppe 2 gliedert sich in 2 Untergruppen auf. Zum einen die Kontrollgruppe, die nur transplantiert wurde, und eine 2. Gruppe, die ab dem Tag der Transplantation innerhalb der ersten 7 Tage 5-malig postoperativ CTLA-4Ig erhalten hat.

Das mediane Überleben der Kontrollgruppe beobachteten wir bei 10 Tagen. Die individuelle Varianz war mit einer Spannweite von 8-12 Tagen in dieser Gruppe sehr gering. Im Gegensatz hierzu überlebten alle Tiere, die längerfristig mit CTLA4-Ig behandelt wurden, über 150 Tage nach ORLT.

Tabelle 8: Überleben der Kontrollgruppe (2.1) sowie einer Gruppe, die über 7 Tage nach allogener ORLT mit 0.5 mg CTLA-4Ig behandelt wurde.

Gruppe	n	Therapie*	Überleben	Median
2.1	7	Kontrolle	8,10,10,10,11,11,12	10
2.2	7	CTLA-4Ig	7 > 150	150

*Tiere der Gruppe 2.2 erhielten an den Tagen 0,1,2,4,7 nach ORLT 0,5 mg CTLA-4Ig i.p.

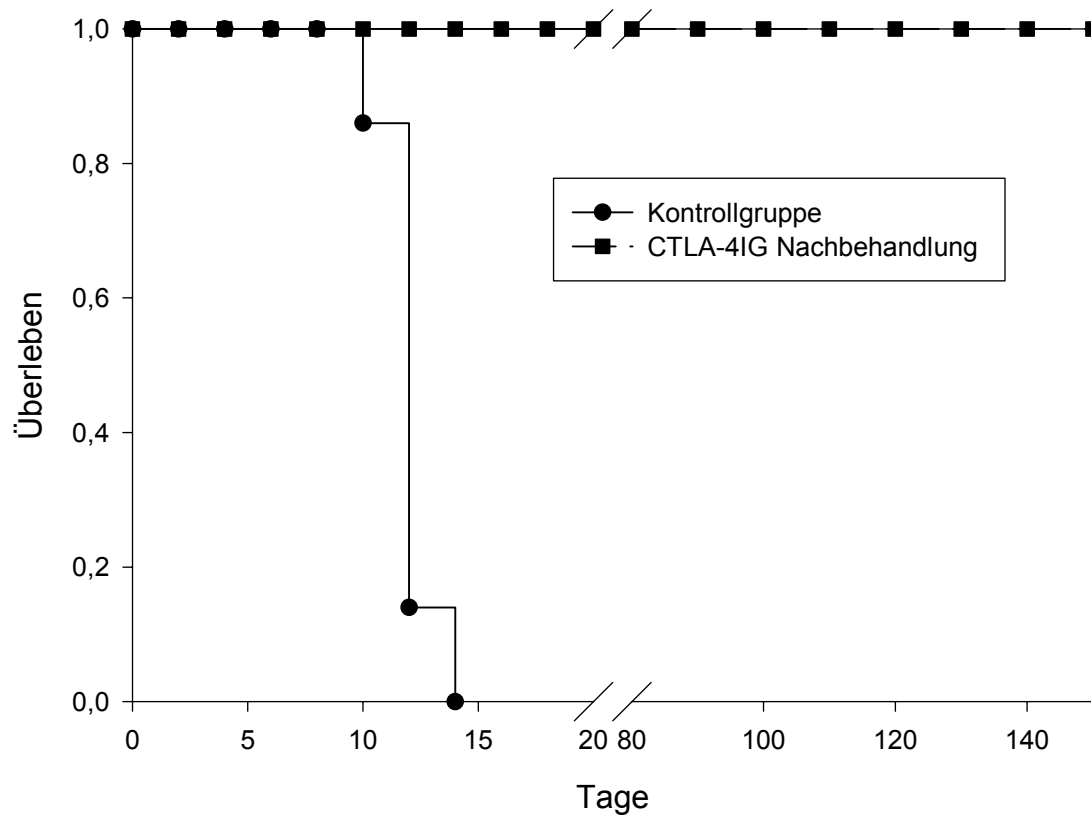


Abbildung 23: Überlebenskurven der Kontrollgruppe und der Nachbehandlungsgruppe mit CTLA-4Ig an 5 Zeitpunkten nach allogener ORLT.

B.2.2.1 Histologische Veränderungen

In der Kontrollgruppe zeigten alle Tiere schon nach 6 Tagen eine ausgeprägte Abstoßung, die bis zum 12. Tag weiter fortschritt. Die CTLA-4Ig nachbehandelten Tiere der Gruppe 2.2 wiesen nach initialen mononukleären Zellinfiltraten im Langzeitverlauf ein homogenes Leberparenchym ohne Anhalt für eine chronische Abstoßung in der H.E. Färbung auf.

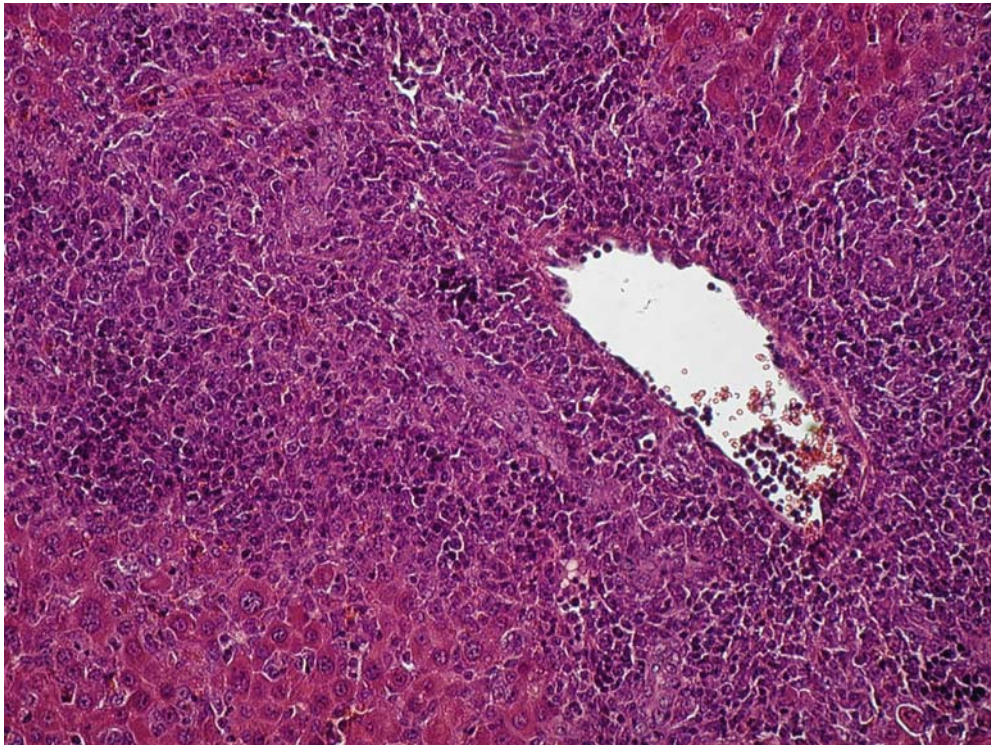


Abbildung 24:

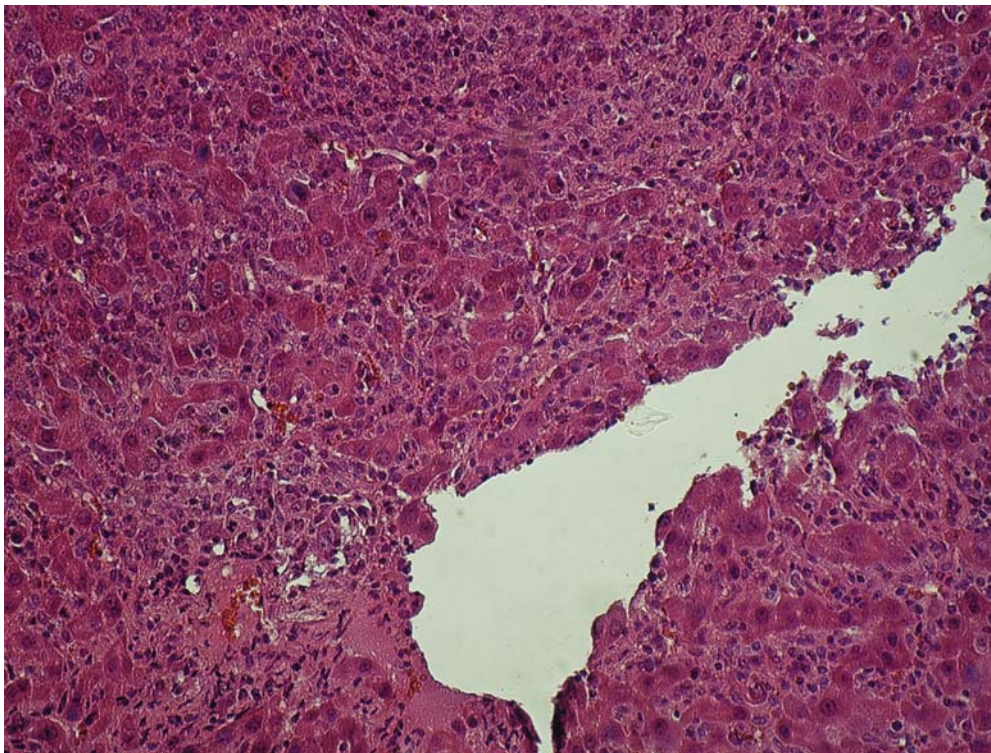


Abbildung 25:

Abbildung 24+25: (H.E. Färbung, x20) Histologie der Leber im Verlauf der akuten Abstoßung nach allogener ORLT im unbehandelten Tier. Schon nach 6 Tagen ausgeprägte mononukleäre Infiltration (Abbildung 24), Gallenwegsläsionen und Einzelzellnekrosen der Hepatozyten. Dieses Bild verstärkt sich in Abbildung 25 (11. Tag nach ORLT) mit flächigen Parenchymnekrosen und ausgeprägten Gallenwegsepithelalterationen.

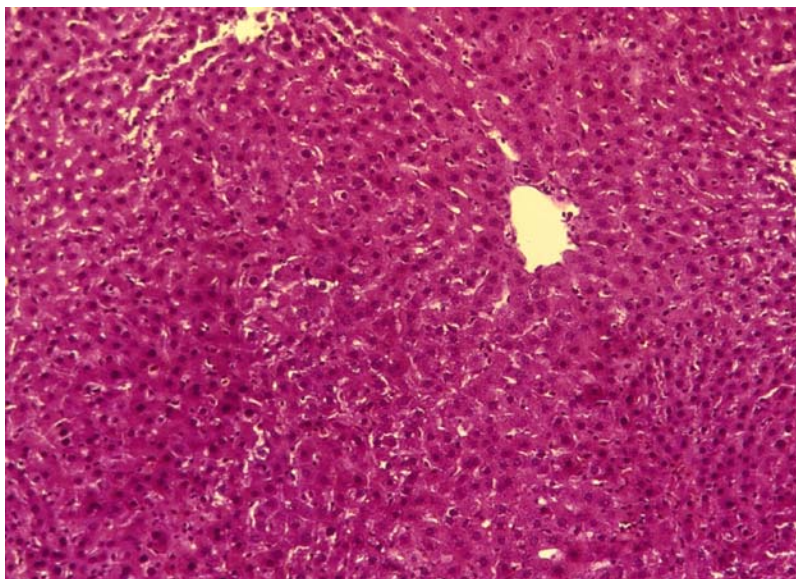
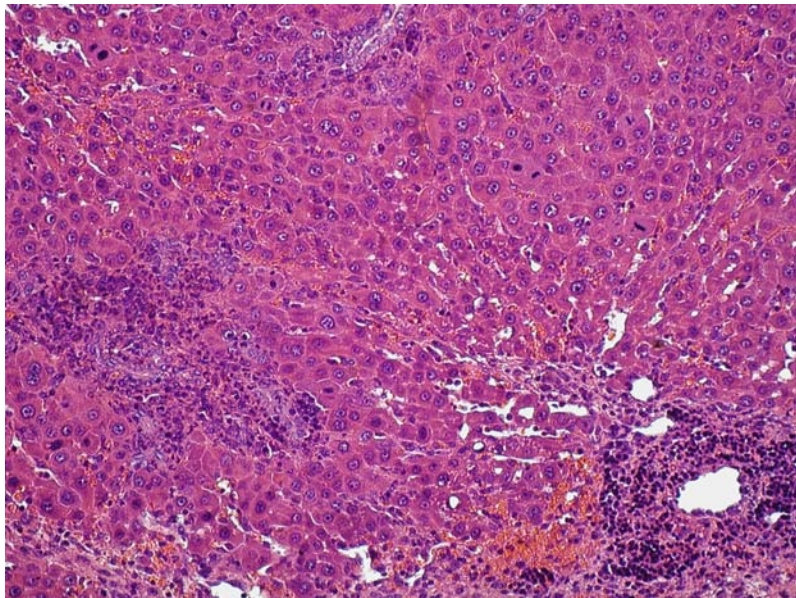
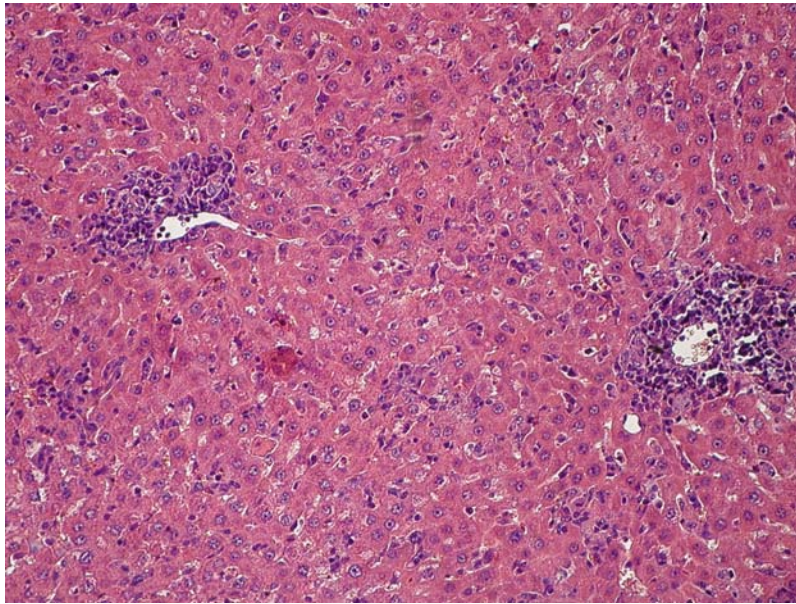


Abbildung 26 + 27 + 28:
(H.E. Färbung, x20)
Nachbehandelte Tiere mit
CTLA-4Ig (Gruppe 2.2)
zeigten nach 6 (Abb. 26) und
12 (Abb. 27) Tagen
zunehmende Infiltration
mononukleärer Zellen mit
einzelnen Nekrosen von
Hepatozyten, die nach 150
(Abb. 28) Tagen nahezu
vollständig verschwanden.

B.2.3 Behandlung ab Tag 3 nach ORLT (Hauptgruppe 3)

Alle Tiere der Hauptgruppe 3 blieben während der ersten beiden Tage nach der Transplantation unbehandelt. Anschließend erfolgte wiederum die Therapie mit Splenozyten (DA- oder BN-) am Tag 4 nach ORLT mit/ohne gleichzeitiger Gabe von CTLA-4Ig in den einzelnen Gruppen (*Tabelle 11*). Empfänger, die nach ORLT ausschließlich BN- oder DA-Splenozyten erhalten hatten, zeigten mit einem Median von 13 bzw. 12 Tagen und einer Spannweite von 10-14 Tagen und 9-14 Tagen kein verbessertes Überleben zu unbehandelten Kontrolltieren der Gruppe 2.1. Im Gegensatz hierzu verlängerte sich das Überleben nach CTLA-4Ig-Nachbehandlung am Tag 3 und 4 auf 30 Tage im Median ($p < 0.05$). Sehr viel effizienter war die zusätzliche Behandlung mit DA-Splenozyten. Im Unterschied zur alleinigen CTLA-4Ig-Therapie verstarb in dieser Gruppe kein Tier vorzeitig, und das mediane Überleben lag bei 150 Tagen, was eine signifikante Verbesserung ($p < 0.05$) bedeutete. Verbessertes Überleben zeigte sich auch bei den Empfängern mit der zusätzlichen Therapie von nicht spenderabgeleiteten BN-Splenozyten mit einem medianen Überleben von 150 (Spannweite 35-150) Tagen. Dieses Ergebnis war jedoch im Vergleich zu der ausschließlich mit CTLA-4Ig behandelten Gruppe (3.3) nicht signifikant verbessert, da in dieser Gruppe 3 Ratten vorzeitig im Rahmen von Abstoßungsepisoden verstarben.

Tabelle 9: Überleben nach Nachbehandlung mit Splenozyten und/oder CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 nach allogener ORLT. Alle vorzeitig verstorbenen Tiere verstarben im Rahmen der Leberinsuffizienz aufgrund einer Abstoßungsepisode.

Gruppe	n	Therapie*	Überleben	Median
3.1	7	DA-Zellen	9,9,10,12,12,13,14	12
3.2	7	BN-Zellen	10,12,12,13,13,14,14	13
3.3	8	CTLA-4Ig	11,14,15,30,57,140, 150,150	30
3.4	7	DA-Zellen+CTLA4-Ig	7 > 150	150
3.5	7	BN-Zellen+CTLA4-Ig	35,40,73,4 > 150	150

*Die Therapie mit spenderabgeleiteten DA- oder nicht spenderabgeleiteten BN- Zellen erfolgte in einer Konzentration von $2,5 \times 10^8$ Zellen am Tag 4 nach Transplantation. CTLA-4Ig wurde den Tieren insgesamt zweimalig an den Tagen 3 und 4 nach der Transplantation appliziert.

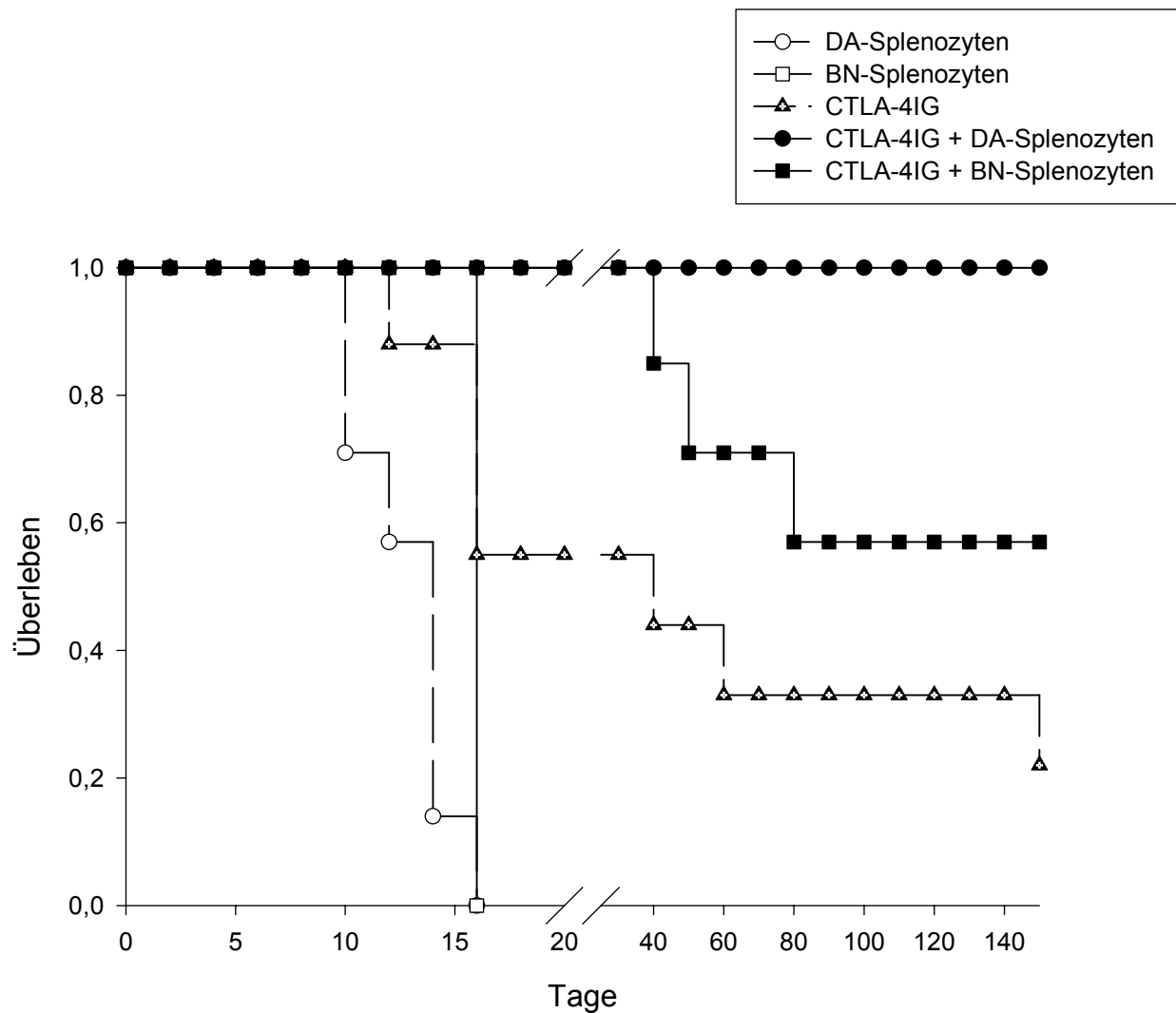


Abbildung 29: Überlebenszeiten der in den verschiedenen Kombinationen mit CTLA-4Ig und Splenozyten nachbehandelten Tiere nach allogener ORLT.

B.2.3.1 Histologische Veränderungen

Alle Transplantate zeigten innerhalb der ersten 6 postoperativen Tage ein starkes Infiltrat periportal mit Beteiligung der Sinusoide. In den Gruppen 3.1 und 3.2 führte dies zu einer ausgeprägten Abstoßungsreaktion mit konfluierenden Nekrosen der Hepatozyten mit Gallenwegsproliferationen, während sich die Rejektion in den Gruppen 3.3-3.5 wieder verbesserte. Bei langzeitüberlebenden Tieren mit DA-Splenozyten und CTLA-4Ig stellte sich nach 150 Tagen normales Lebergewebe mit nur noch geringer lymphozytärer Infiltration dar. Die Tiere der Gruppe 3.3 mit CTLA-4Ig-Behandlung und 3.5 mit zusätzlicher unspezifischer BN-Splenozyten-Behandlung zeigten im weiteren Verlauf chronische Veränderungen mit zunehmenden Gallenwegsläsionen.

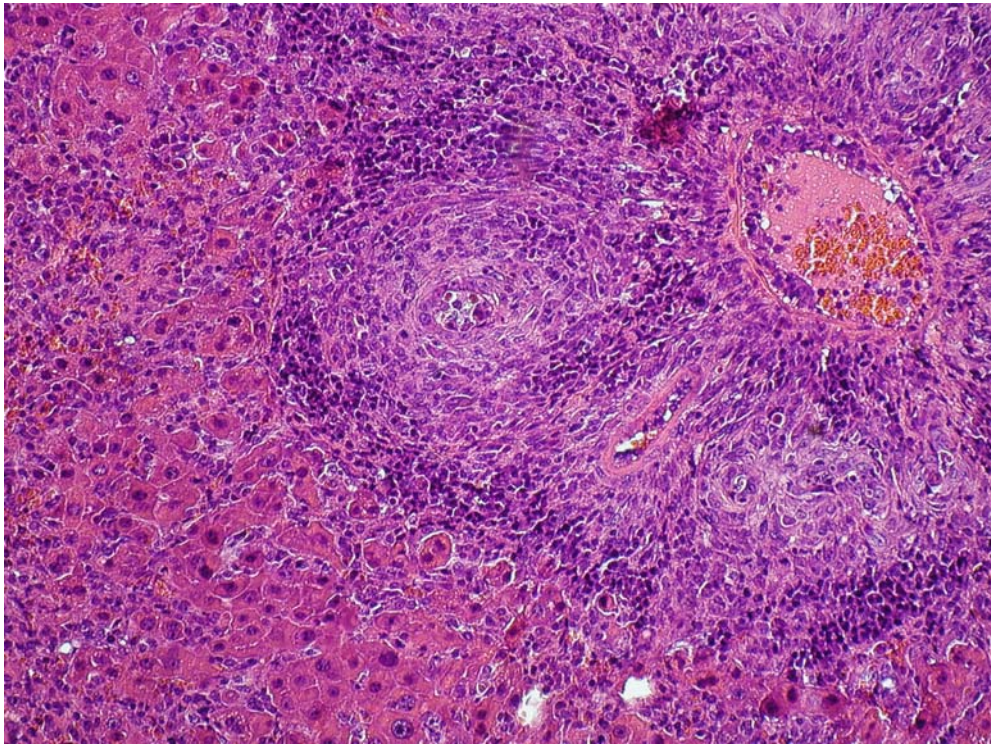


Abbildung 30: (H.E. Färbung, x20) Histologischer Schnitt der Leber am Tag 12 nach allogener ORLT in einem Empfänger, der mit DA-Splenozyten nachbehandelt wurde. Das Bild zeigt ausgedehnte mononukleäre Infiltrate, Gallenwegsalterationen und Nekrosen.

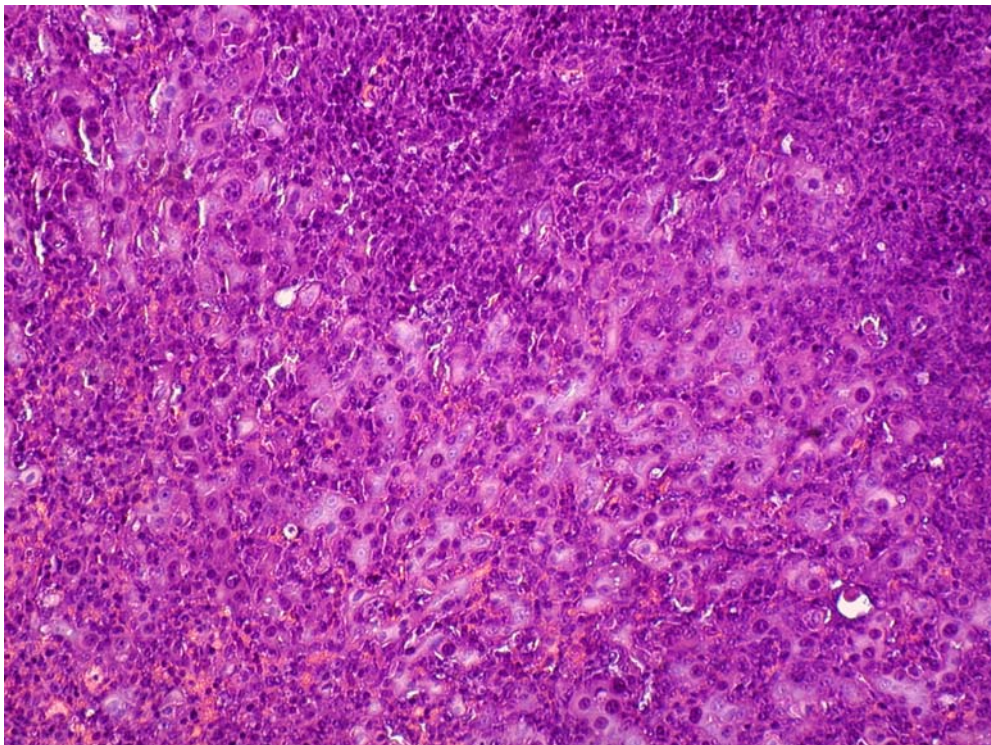


Abbildung 31: (H.E. Färbung, x20) Histologischer Schnitt der Leber einer Ratte am 12. POD nach allogener ORLT, die mit BN-Splenozyten am 4. postoperativen Tag nachbehandelt wurde. Die Histologie zeigt nur noch wenig verbliebene Hepatozyten und ausgedehnte mononukleäre Infiltrate aufweist.

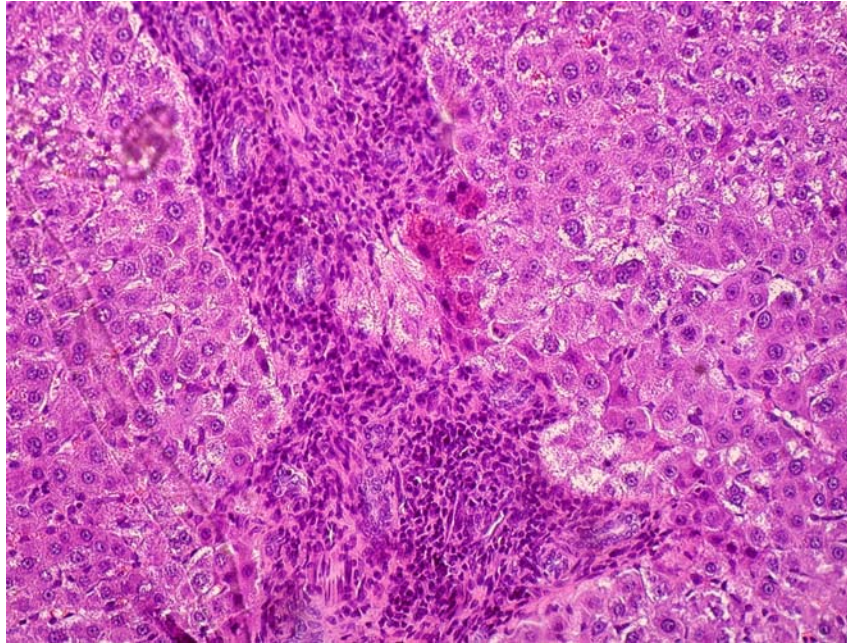


Abbildung 32: (H.E. Färbung, x20) Langzeitüberlebendes Tier, das mit CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 nach allogener ORLT behandelt wurde. Ausgedehnte mononukleäre Infiltrate mit Gallenwegsproliferationen und Nekrosen der Hepatozyten.

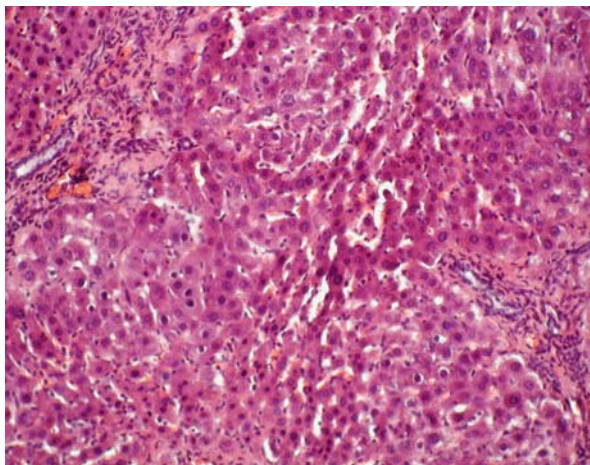


Abbildung 33:

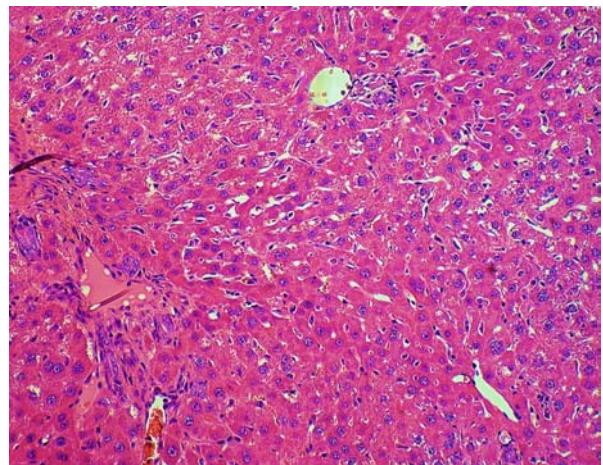


Abbildung 34:

Abbildung 33 + 34: (H.E. Färbung, x20) Die langzeitüberlebenden Tiere nach allogener ORLT der kombiniert mit BN-Splenozyten und CTLA-4Ig behandelten Tiere zeigten trotz guter Überlebensdaten ein ausgeprägtes Infiltrat im Lebergewebe mit Gallenwegsproliferationen (Abb. 33), das bei mit DA-Splenozyten behandelten Tieren deutlich weniger ausgeprägt war (Abb. 34).

C. Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen

In jeder Gruppe wurden bei jeweils 3 Tieren alle molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt. Da in den Gruppen 1.2; 2.1; 3.1; 3.2 am Tag 12 nahezu alle Ratten im Rahmen der Abstoßungsepisoden und konsekutiver Leberinsuffizienz verstorben waren, wurden in diesen Gruppen Tag 12 und Langzeitüberleben nicht getrennt betrachtet.

C.1 Zytokin-Bestimmungen

C.1.1 Interleukin-2

C.1.1.1 CD25-Expression (Interleukin-2-Rezeptor) in Immunhistochemien der Leber

Die Proteinexpression von CD25 (*Tabelle 10*) in den Lebern war in den Gruppen, die kein CTLA-4Ig (1.1; 1.2; 2.2; 3.1, 3.2) erhielten, deutlicher ausgeprägt. Nach 6 Tagen fand sich in der Kontrollgruppe sowie in den Gruppen 1.1; 1.2; 3.1; und 3.2 bereits ein globales Infiltrat mit CD25-positiven Zellen, das sowohl die Portalfelder als auch die Sinusoide betraf. Die Behandlung mit CTLA-4Ig zu jedem Zeitpunkt führte zu einer deutlichen Reduktion der CD25-Expression. Im Langzeitverlauf fanden sich auch bei langfristig überlebenden Tieren noch vereinzelt CD25-positive Zellen im Leberparenchym.

Tabelle 10: (Immunhistochemie anti-CD25, Serotec) Ausprägung der CD25-positiven Zellen in der Leber nach allogener ORLT in Abhängigkeit der Applikation von CTLA-4Ig und spenderabgeleiteter oder nicht spenderabgeleiteter Milzzellen vor und nach der Lebertransplantation. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet (- keine, + wenig, ++ mittel, +++ viel Farbintensität).

Gruppe	Therapie*	Tag 6	Tag 12	Langzeit
<i>Vorbehandlung</i>				
1.1	DA-Zellen	+ / + / ++	++ / +++ / +++	++ / +++ / +++
1.2	BN-Zellen	++ / +++ / +++		++ / +++ / +++
1.3	CTLA-4Ig	++ / ++ / +++	++ / ++ / +++	++ / ++ / ++
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+ / + / +	- / - / +	- / - / +
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	+ / ++ / +++	+ / + / ++	++ / ++ / +++
<i>Synchrone Behandlung</i>				
2.1	Kontrolle	+++ / +++ / +++		++ / +++ / +++
2.2	CTLA-4Ig	++ / ++ / +++	- / - / +	- / + / ++
<i>Nachbehandlung</i>				
3.1	DA-Zellen	+ / ++ / +++		++ / ++ / ++
3.2	BN-Zellen	++ / ++ / +++		++ / ++ / +++
3.3	CTLA-4Ig	- / + / +	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+ / + / ++	+ / + / +	- / + / +
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	- / - / +	+ / + / +	+ / + / ++

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

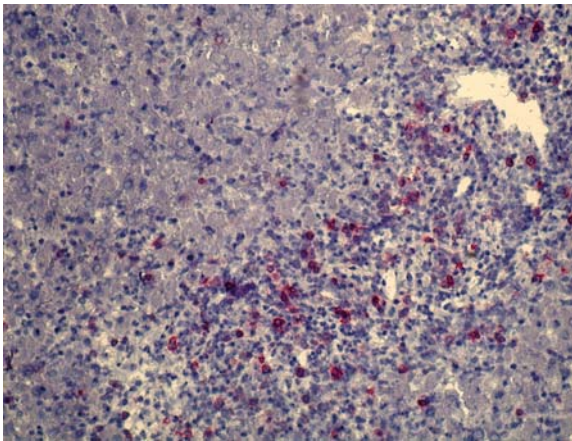


Abbildung 35:

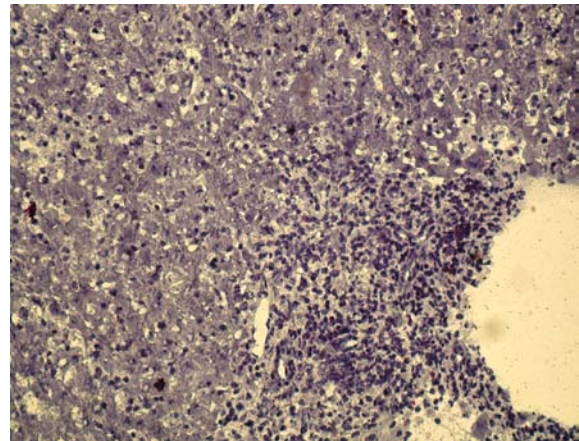


Abbildung 36:

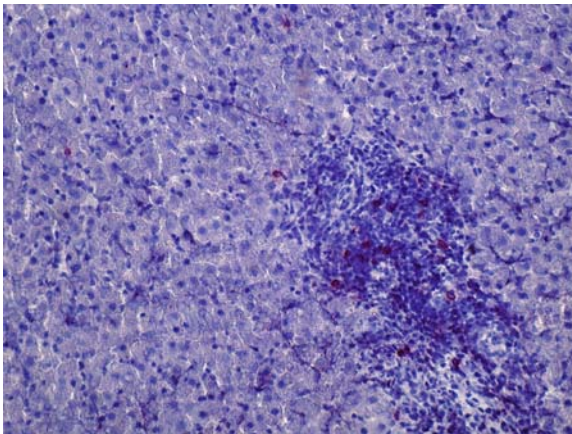


Abbildung 37:

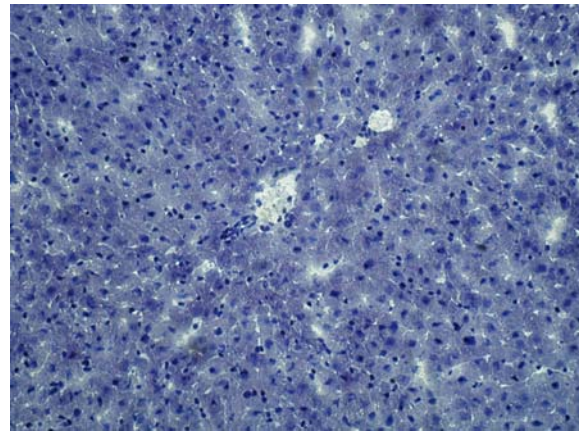


Abbildung 38:

Abbildung 35-38: (Immunhistochemie der Leber mit anti-CD25 x 20, Serotec) Abbildung 35 zeigt die Ausprägung von CD25 in einem Kontrolltier (Gruppe 2.1) am 6. POD nach allogener ORLT. Die Expression von CD25 am Tag 6 nach ORLT bei einem mit CTLA-4Ig und nicht spenderabgeleiteter BN-Milzzellen nachbehandelten Tier (Abb. 36, CTLA-4Ig + BN, 6. POD, Gruppe 3.5) war deutlich geringer ausgeprägt. Das gleiche Bild zeigte sich am 12. postoperativen Tag mit geringer CD25-Expression bei einem vorbehandelten Tier mit CTLA-4Ig und nicht spenderabgeleiteten BN-Milzzellen (Abb. 37, CTLA-Ig + BN, 12. POD, Gruppe 1.5). Abbildung 38 zeigt die Expression von CD25 mehr als 150 Tage nach allogener ORLT und Therapie mit spenderabgeleiteten DA-Milzzellen und CTLA-4Ig vor der Transplantation (Abb. 38, CTLA-4Ig + DA, POD 150, Gruppe 1.4).

C.1.1.2 Interleukin-2 mRNA-Transskripte im Lebergewebe

Die Expression der IL-2 mRNA Transskripte im Lebergewebe war in allen CTLA-4Ig behandelten Gruppen an dem 6. + 12. POD relativ gering. Die stärkste Ausprägung fand sich in den Kontrollgruppen. Langzeittiere, die mit CTLA-4 Ig und DA-Splenozyten behandelt wurden zeigten nahezu keine IL-2 mRNA Expression.

Tabelle 11: Nachweis von IL-2 mRNA Transskripten im Lebergewebe nach allogener ORLT. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

Gruppe	Therapie*	Tag 6	Tag 12	Langzeit
	<i>Vorbehandlung</i>			
1.1	DA-Zellen	+ / + / ++	+ / ++ / ++	++ / ++ / ++
1.2	BN-Zellen	++ / ++ / ++		+ + / ++ / +++
1.3	CTLA-4Ig	- / - / +	+ / + / +++	- / + / +
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	- / + / +	+ / + / ++	- / - / +
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	+ / + / +	+ / + / ++	- / + / +
	<i>Synchrone Behandlung</i>			
2.1	Kontrolle	++ / +++ / +++		++ / +++ / +++
2.2	CTLA-4Ig	+ / + / ++	+ / + / +	- / + / +
	<i>Nachbehandlung</i>			
3.1	DA-Zellen	++ / ++ / ++		+ / ++ / ++
3.2	BN-Zellen	+ / + / ++		+ / + / ++
3.3	CTLA-4Ig	- / - / +	- / + / ++	+ / + / ++
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	- / - / ++	+ / ++ / ++	- / - / -
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	- / - / +	- / + / +	+ / + / +

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

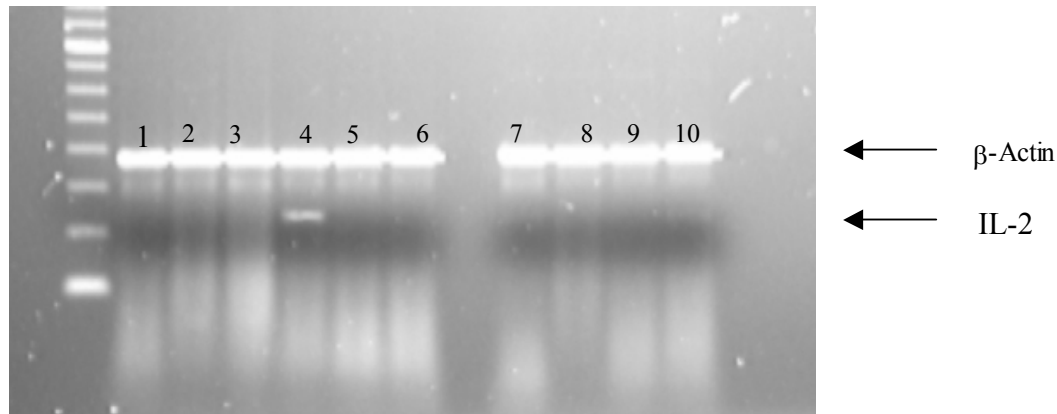


Abbildung 39: Darstellung der IL-2 PCR-Produkte im Lebergewebe nach allogener ORLT. Die obere Bande zeigt die PCR-Produkte für β -Actin auf und weist die gleiche Menge eingebrachter mRNA nach. Mit CTLA-4Ig vorbehandelte (1=CTLA-4Ig prä ORLT, 2=CTLA-4Ig+DA-Zellen prä ORLT, 3=CTLA-4Ig+BN-Zellen prä ORLT) Ratten zeigten einen geringen Nachweis der mRNA für IL-2 6 Tage nach ORLT. Die PCR-Produkte für IL-2 waren in der Kontrolle am Tag 6 dahingegen stark ausgeprägt (4). Mit CTLA-4Ig und Zellen nachbehandelte Tiere (5=CTLA-4Ig+DA-Zellen post ORLT und 6=CTLA-4Ig+BN-Zellen post ORLT) hatten wiederum wieder weniger IL-2 PCR-Produkte am 6. POD. Langzeittiere mehr als 150 Tage nach ORLT zeigten nur eine geringe Expression von IL-2 PCR-Produkten (7=CTLA-4Ig post ORLT, 8=CTLA-4Ig+DA-Zellen prä ORLT, 9=CTLA-4Ig+DA-Zellen post ORLT, 10= CTLA-4Ig+BN-Zellen post ORLT).

C.1.1.3 CD25-Expression (Interleukin-2-Rezeptor) in Immunhistochemien der Milz

Die Proteinexpression von CD25 (Tabelle 12) in der Milz war in den Gruppen, die kein CTLA-4Ig erhielten, deutlicher ausgeprägt. Ausschließlich in den nur mit CTLA-4Ig am Tag 3 und 4 nachbehandelten Tieren fand sich nahezu keine CD25 Expression im Milzgewebe. Im Langzeitverlauf, auch bei überlebenden Tieren fanden sich noch vereinzelte CD25-positive Zellen im Milzparenchym. Tiere mit einer Abstoßungsreaktion zeigten eine deutlichere Ausprägung von CD25 im Gewebe.

Tabelle 12: (Immunhistochemie anti-CD25, Serotec) Ausprägung der CD25-Expression nach allogener ORLT in der Milz in Abhängigkeit der verschiedenen Therapieprotokolle. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet (- keine, + wenig, ++ mittel, +++ viel Farbinsintensität).

Gruppe	Therapie*	Tag 6	Tag 12	Langzeit
	<i>Vorbehandlung</i>			
1.1	DA-Zellen	+ / + / ++	+ / ++ / ++	+ / + / ++
1.2	BN-Zellen	+ / + / ++		++ / ++ / +++
1.3	CTLA-4Ig	+ / + / ++	+ / ++ / ++	++ / +++ / +++
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	- / - / +	+ / ++ / ++	- / + / +
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	+ / ++ / ++	+ / + / ++	+ / ++ / +++
	<i>Synchrone Behandlung</i>			
2.1	Kontrolle	++ / +++ / +++		++ / ++ / ++
2.2	CTLA-4Ig	+ / + / ++	+ / + / ++	++ / ++ / +++
	<i>Nachbehandlung</i>			
3.1	DA-Zellen	+ / ++ / ++		++ / ++ / +++
3.2	BN-Zellen	++ / ++ / +++		+ / ++ / +++
3.3	CTLA-4Ig	- / - / ++	+ / + / +	+ / ++ / +++
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+ / + / ++	+ / ++ / ++	+ / + / +++
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	+ / + / ++	+ / + / ++	+ / + / +

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie, und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

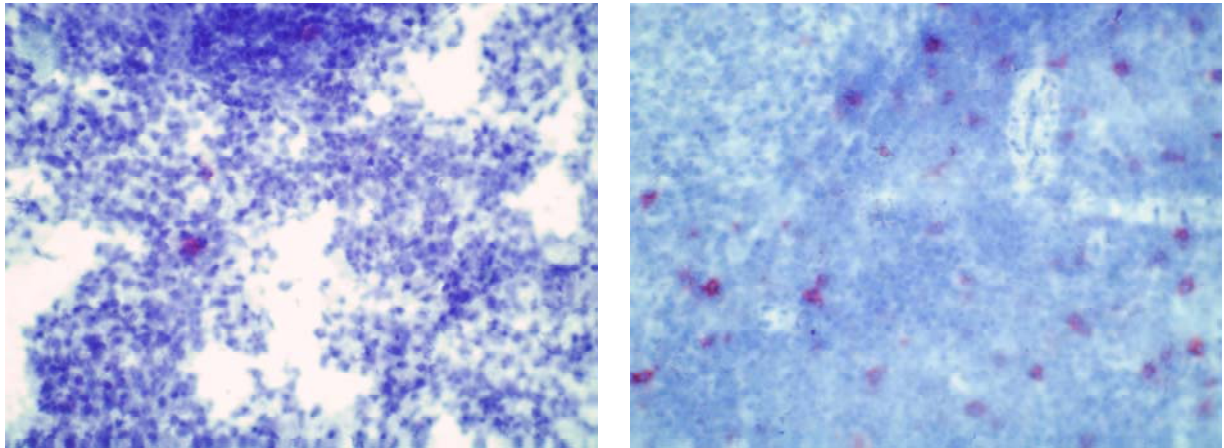


Abbildung 40 + 41: (Immunhistochemie der Milz mit anti-CD25, x20, Serotec) Nur geringe Anfärbungen CD25-positiver Splenozyten am Tag 6 nach ORLT bei mit CTLA-4Ig und DA-Splenozyten (Abb. 40) vorbehandelten Ratten, während sich in der Kontrollgruppe die Farbtintensität deutlich verstärkte (Abb. 41).

C.1.2 Interleukin-4 mRNA-Transskripte im Lebergewebe

Die Expression von IL-4 mRNA-Transskripten im Lebergewebe war in allen Gruppen ähnlich ausgeprägt. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen durch adoptiven Zelltransfer oder CTLA-4Ig-Behandlung. Auch Tiere 150 Tage nach ORLT zeigten eine deutliche Expression der IL-4 mRNA-Transskripte im Lebergewebe.

Tabelle 13: Expression der IL-4 mRNA Transskripte im Lebergewebe nach allogener ORLT. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

Gruppe	Therapie*	Tag 6	Tag 12	Langzeit
	<i>Vorbehandlung</i>			
1.1	DA-Zellen	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++
1.2	BN-Zellen	+ / + / ++		+ / ++ / ++
1.3	CTLA-4Ig	+ / ++ / ++	+ / ++ / +++	- / ++ / ++
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	++ / ++ / +++	++ / +++ / +++	++ / ++ / ++
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	++ / ++ / +++	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++
	<i>Synchrone Behandlung</i>			
2.1	Kontrolle	++ / +++ / +++		++ / ++ / +++
2.2	CTLA-4Ig	++ / +++ / +++	++ / ++ / +++	+ / + / +
	<i>Nachbehandlung</i>			
3.1	DA-Zellen	+ / ++ / +++		+ / ++ ++
3.2	BN-Zellen	+++ / +++ / +++		+++ / +++ / +++
3.3	CTLA-4Ig	+++ / +++ / +++	+ / ++ / ++	- / + / ++
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	++ / +++ / +++	+++ / +++ / +++	- / ++ / ++
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++	+ / + / +++

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie, und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

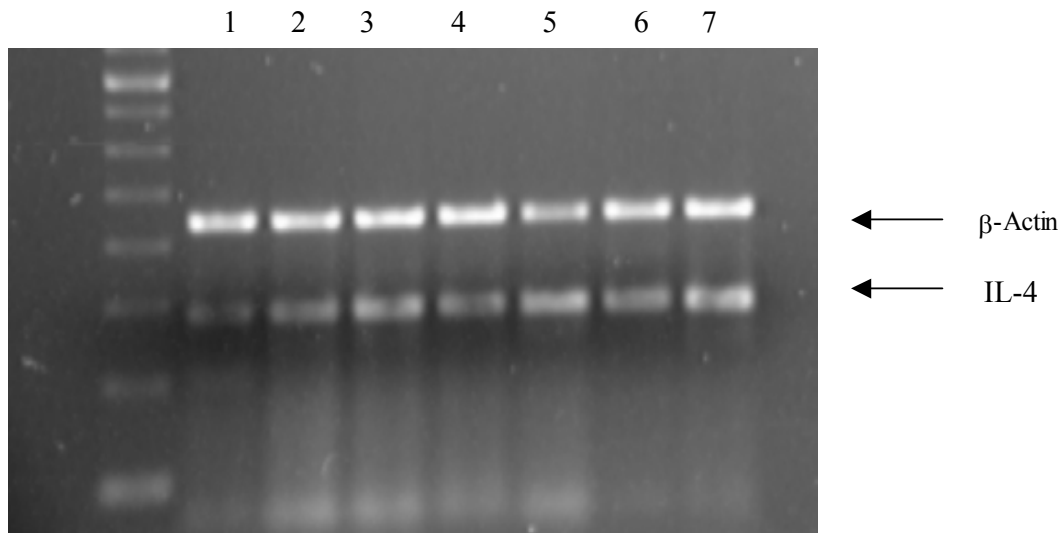


Abbildung 42: Die Expression der IL-4 PCR-Produkte im Lebergewebe zeigte insbesondere in der frühen Phase am Tag 6 nach ORLT keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die oberen Banden stellen die β -Actin PCR-Produkte zum Nachweis gleicher mRNA-Gehalte in den Proben dar. In vorbehandelten Ratten (1= CTLA-4Ig, 2=CTLA-4Ig+DA-Zellen, 3=CTLA-4Ig+BN-Zellen,), der Kontrolle (4) und nachbehandelten Tieren (5=CTLA-4Ig postoperativ ab ORLT, 6=CTLA-4Ig+DA-Zellen, 7=CTLA-4Ig+BN-Zellen) zeigten sich keine Unterschiede am 6. POD.

C.1.3 Interleukin-10 mRNA-Transskripte im Lebergewebe

Die Expression von IL-10 mRNA Transskripten im Lebergewebe war in der Kontrollgruppe und den nachbehandelten Tieren am 6. POD am deutlichsten ausgeprägt. Langzeittiere mehr als 150 Tage nach ORLT hatten nur noch eine geringe bis keine Expression von IL-10 mRNA im Lebergewebe. Es ergaben sich keine Veränderungen durch adoptiven Zelltransfer oder CTLA-4Ig-Behandlung.

Tabelle 14: Nachweis von IL-10-Transskripten im Lebergewebe nach allogener ORLT. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

Gruppe	Therapie*	Tag 6	Tag 12	Langzeit
	<i>Vorbehandlung</i>			
1.1	DA-Zellen	+ / ++ / ++	+++ / +++ / +++	+++ / +++ / +++
1.2	BN-Zellen	++ / ++ / ++		++ / ++ / ++
1.3	CTLA-4Ig	- / + / +	++ / ++ / ++	++ / ++ / ++
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++	+ / + / +
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	++ / ++ / ++	++ / ++ / ++	- / - / -
	<i>Synchrone Behandlung</i>			
2.1	Kontrolle	++ / +++ / +++		+++ / +++ / +++
2.2	CTLA-4Ig	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++	- / - / +
	<i>Nachbehandlung</i>			
3.1	DA-Zellen	++ / ++ / ++		++ / ++ / +++
3.2	BN-Zellen	+ / + / +		+ / + / ++
3.3	CTLA-4Ig	- / ++ / +++	+++ / +++ / +++	++ / +++ / +++
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	++ / +++ / +++	+ / ++ / ++	+ / ++ / ++
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	++ / ++ / +++	++ / ++ / ++	+ / + / ++

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie, und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

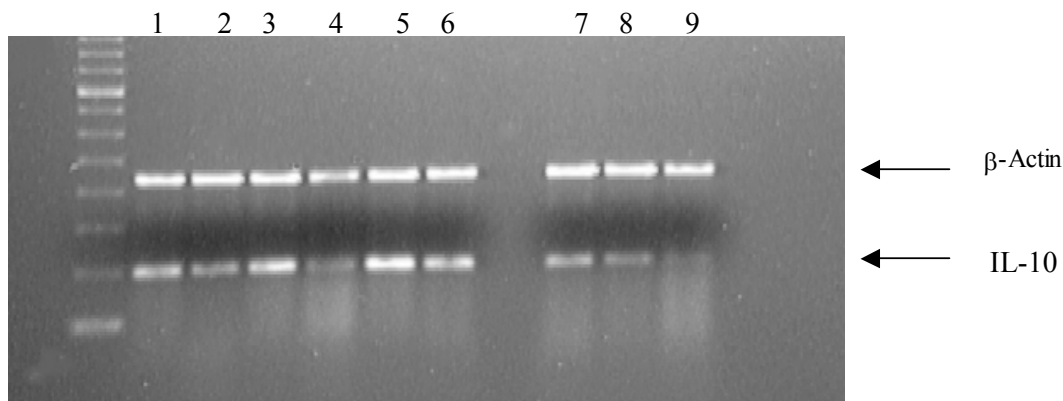


Abbildung 43: Ausprägung der IL-10 PCR-Produkte im Lebergewebe in den unterschiedlich behandelten Ratten. Die obere Bande zeigt die β -Actin PCR-Produkte zum Nachweis ähnlicher mRNA-Mengen in den Proben. Tiere mit CTLA-4Ig (1) oder CTLA-4Ig und DA-Milzzellen (2) vor ORLT und das Tier mit CTLA-4Ig ab dem Tag der Transplantation zeigten am 6. POD einen etwas geringeren Nachweis der IL-10 mRNA Transskripte als die Kontrolltiere (3, Gruppe 2.1) und die nachbehandelten Tiere (5=CTLA-4Ig+DA-Milzzellen, 6=CTLA-4Ig+BN-Milzzellen). Bei den Tieren 7-9 handelt es sich um langzeitüberlebende Tiere mehr als 150 Tage nach der ORLT (7=CTLA-4Ig postoperativ, 8=CTLA-4Ig+DA-Milzzellen präoperativ, 9=CTLA-4Ig+BN-Milzzellen postoperativ).

C.1.4 Interleukin-12 β 2 mRNA-Transskripte im Lebergewebe

Der Nachweis von IL-12 β 2 mRNA-Transskripten war im Lebergewebe in der Kontrollgruppe erst ab dem 12. POD ausgeprägt. Tiere, die vorbehandelt wurden, zeigten schon früh eine erhöhte IL-12 β 2-Expression am Tag 6 nach ORLT. Die IL-12 β -Expression war vermehrt bei Tieren mit adoptiven Zelltransfer. Nach Transplantation zeigten alle Gruppen mit einem medianen Überleben > 150 Tage (1.4, 1.5, 2.2, 3.4; 3.5) im Langzeitverlauf eine geringe IL-12 β 2 mRNA-Expression.

Tabelle 15: Nachweis von *IL-12 β 2* mRNA-Transskripten im Lebergewebe nach allogener ORLT. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

Gruppe	Therapie*	Tag 6	Tag 12	Langzeit
<i>Vorbehandlung</i>				
1.1	DA-Zellen	+ / + / ++	- / + / +++	- / + / +
1.2	BN-Zellen	- / +		-
1.3	CTLA-4Ig	- / + / +	+ / + / +	+ / ++ / ++
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+ / ++ / ++	++ / ++ / ++	- / - / +
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	++ / ++ / +++	+ / ++ / +++	- / - / +
<i>Synchrone Behandlung</i>				
2.1	Kontrolle	- / - / -		+++ / +++ / +++
2.2	CTLA-4Ig	+ / ++ / ++	+ / + / +	- / - / -
<i>Nachbehandlung</i>				
3.1	DA-Zellen	++ / ++ / +++		- / + / +++
3.2	BN-Zellen	- / + / +		+ / + / ++
3.3	CTLA-4Ig	- / + / +	+ / + / +	+ / + / ++
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	- / + / +	+ / + / +	- / + / +
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	- / + / +	- / + / +	- / - / +

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie, und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

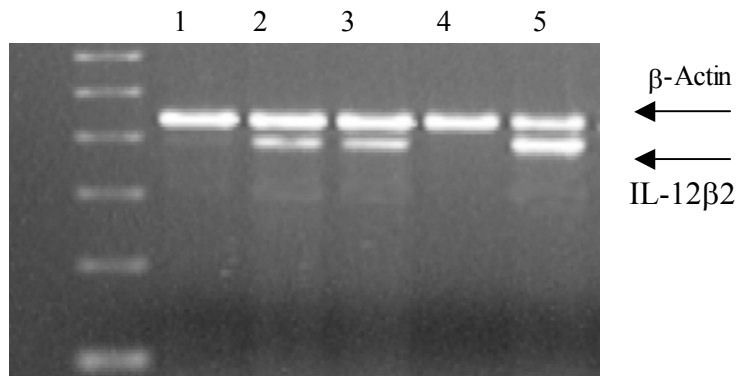


Abbildung 44: Nachweis der IL-12 β 2 mRNA Transskripte im Lebergewebe nach allogener ORLT. Die obere Bande weist β -Actin nach. Tier 1 stellt die IL-12 β 2 PCR-Produkte am 6. POD bei einem mit CTLA-4Ig vorbehandelten Tier dar. Eine stärkere Ausprägung fand sich bei kombiniert mit CTLA-4Ig und Milzzellen behandelten Tieren (2=CTLA-4Ig+DA-Milzzellen, 3=CTLA-4Ig+BN-Milzzellen). Das unbehandelte Kontrolltier zeigte keinen Nachweis von IL-12 β 2 PCR-Produkten am 6. POD (4). Tier 5 wurde ab der ORLT mit CTLA-4Ig behandelt und ebenfalls am 6. POD getötet.

C.1.5 Interferon- γ mRNA-Transskripte im Lebergewebe

Der Nachweis von Interferon- γ mRNA im Lebergewebe war in der Kontrollgruppe erst am 12. POD stark ausgeprägt. Tiere, die vorbehandelt wurden, zeigten schon früh eine erhöhte Interferon- γ -Expression am Tag 6. Die Interferon- γ -Expression war vermehrt bei Tieren mit adoptivem Zelltransfer. Nach Transplantation zeigten langzeitüberlebende Gruppen (1.4; 1.5; 2.2; 3.4; 3.5) nahezu keine Interferon- γ mRNA-Expression mehr.

Tabelle 16: Expression von Interferon- γ mRNA-Transskripten im Lebergewebe nach allogener ORLT. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

Gruppe	Therapie	Tag 6	Tag 12	Langzeit
<i>Vorbehandlung</i>				
1.1	DA-Zellen	++ / ++ / +++	+++ / +++ / +++	+ / ++ / ++
1.2	BN-Zellen	++ / ++ / +++		++ / ++ / +++
1.3	CTLA-4Ig	+ / + / +	- / + / +	+ / ++ / ++
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	++ / +++ / +++	+++ / +++ / +++	- / + / +
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	+++ / +++ / +++	+++ / +++ / +++	- / + / +
<i>Synchrone Behandlung</i>				
2.1	Kontrolle	- / - / +		++ / ++ / +++
2.2	CTLA-4Ig	++ / +++ / +++	++ / +++ / +++	- / - / +
<i>Nachbehandlung</i>				
3.1	DA-Zellen	++ / +++ / +++		++ / +++ / +++
3.2	BN-Zellen	- / - / -		- / + / ++
3.3	CTLA-4Ig	- / ++ / +++	- / + / +++	+ / ++ / +++
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+ / + / ++	+ / ++ / ++	- / + / +
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	- / + / ++	+ / + / ++	- / - / +

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie, und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

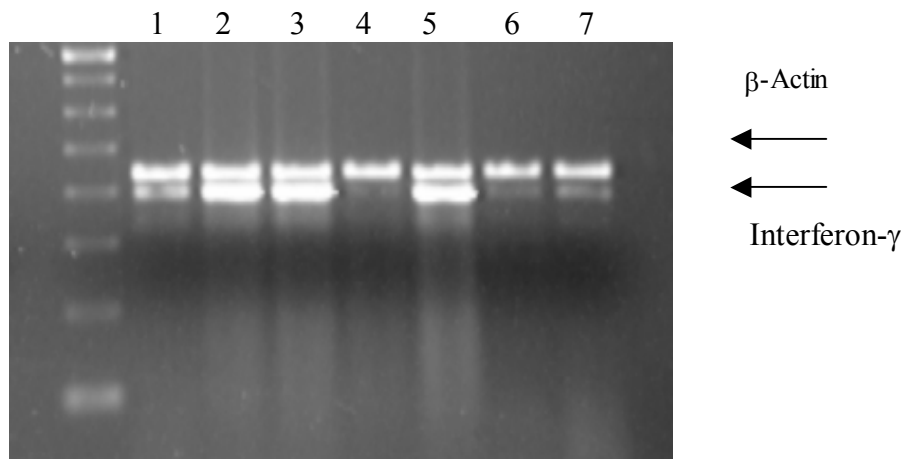


Abbildung 45: Nachweis der Interferon- γ PCR-Produkte im Lebergewebe nach allogener ORLT. Die obere Bande weist die mRNA-Menge durch den Nachweis von β -Actin PCR-Produkten nach. Tier 1 wurde vor ORLT mit CTLA-4Ig behandelt. Tier 2 erhielt zusätzlich zu der CTLA-4Ig-Behandlung noch DA-Milzzellen und Tier 3 BN-Milzzellen. Tier 4 stellt ein Tier aus der Kontrollgruppe nach ORLT ohne weitere Therapie dar. Tier 5 wurde mit CTLA-4Ig zum Zeitpunkt der Transplantation behandelt. Tiere mit CTLA-4Ig und adoptivem Zelltransfer nach ORLT haben an dem 6. POD noch keine ausgeprägte Interferon- γ -Expression (6=CTLA-4Ig+DA-Milzzellen, 7=CTLA-4Ig+BN-Milzzellen).

C.2 Chimärismus

C.2.1 Immunhistochemie anti-rat RT1A^{a,b}

Der Nachweis spenderspezifischer Zellen erfolgte mit dem RT1A^{a,b}-Antikörper, der mit dem Epitop S des Ratten-MHC-I-Komplexes von DA-Ratten, nicht aber mit dem von Lewis-Ratten reagiert.

Die Proteinexpression spenderabgeleiteter Zellen in den Milzen war am Tag 6 nach ORLT in allen Gruppen vorhanden. Nach 12 Tagen fanden sich in den Gruppen 1.4 (CTLA-4Ig+DA-Zellen), 2.2 (CTLA-4Ig zur ORLT), 3.4 (CTLA-4Ig+DA-Zellen nach ORLT) noch ausgeprägte spenderabgeleitete Anfärbungen in der Milz, welche im Langzeitverlauf nur noch vereinzelt bei wenigen Tieren nachweisbar waren.

Tabelle 17: Nachweis von spenderabgeleitetem MHC-I in der Milz der Empfänger nach allogener ORLT. Hierbei wurden ausschließlich DA-Zellen mittels dem RT1A^{a,b}-Antikörper nachgewiesen. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet (- keine, + wenig, ++ mittel, +++ viel Farbintensität).

Gruppe	Therapie	Tag 6	Tag 12	Langzeit
<i>Vorbehandlung</i>				
1.1	DA-Zellen	+ / + / +	- / - / +	- / - / -
1.2	BN-Zellen	- / - / ++		- / - / -
1.3	CTLA-4Ig	++ / ++ / +++	- / - / +	- / - / +
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+++ / +++ / +++	++ / ++ / +++	- / + / +
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	+++ / +++ / +++	- / - / +	- / - / -
<i>Synchrone Behandlung</i>				
2.1	Kontrolle	- / + / ++		- / - / -
2.2	CTLA-4Ig	++ / ++ / +++	++ / ++ / ++	+ / + / +
<i>Nachbehandlung</i>				
3.1	DA-Zellen	- / - / +		- / - / -
3.2	BN-Zellen	- / - / ++		- / - / -
3.3	CTLA-4Ig	+ / + / +	- / - / +	- / - / +
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	++ / ++ / +++	+ / + / ++	- / - / +
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	+ / ++ / ++	- / + / +	- / - / +

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie, und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

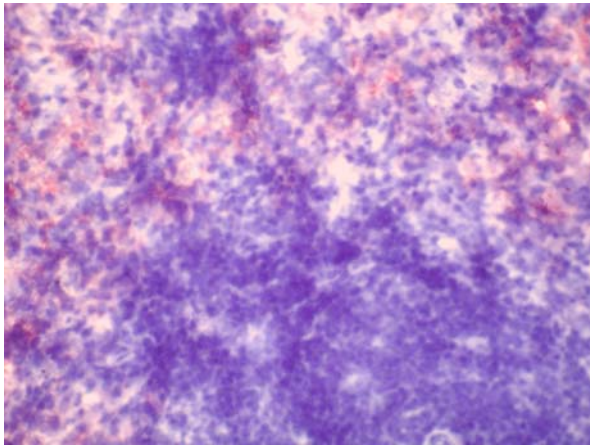
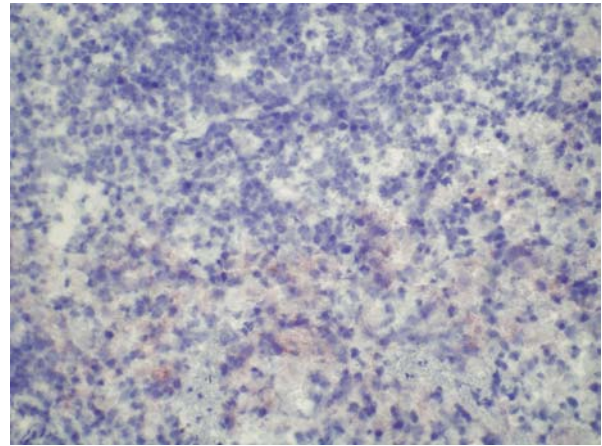
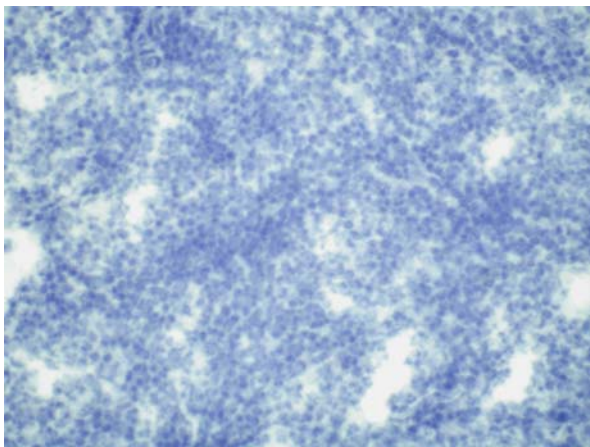
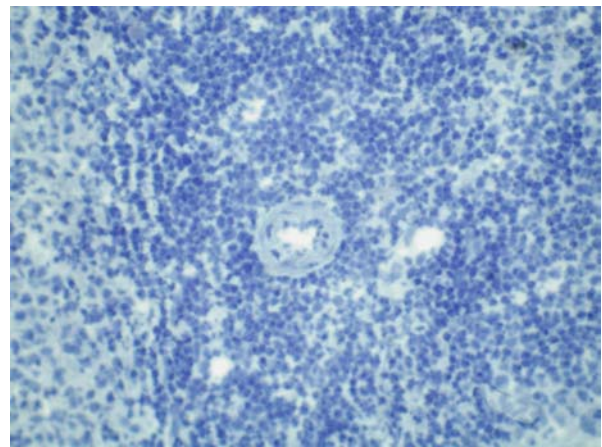
**Abbildung 46:****Abbildung 47:****Abbildung 48:****Abbildung 49:**

Abbildung 46-49: (Immunhistochemie anti-rat RT1A^{a,b}, x20) Nachweis spenderabgeleiteter Zellen in der Milz von Empfängern einer allogenen ORLT. Nachweis von spenderabgeleitetem Antigen bei mit CTLA-4Ig und DA-Splenozyten vorbehandelten Tieren am Tag 12 (Abb.46) und im Langzeitverlauf (Abb.47), während bei Kontrolltieren (Abb.48) schon nach 12 Tagen keine spenderabgeleiteten Zellen mehr nachweisbar waren. Auch mit BN-Splenozyten und CTLA-4Ig behandelte Tiere zeigten im Langzeitverlauf keinen Nachweis von DA-RT1A^{ab} in der Milz (Abb.49)

C.3 Apoptose-Nachweise

C.3.1 PARP-Western Blot

Mit dem PARP Western-Blot wurden die DNA-Fragmente nachgewiesen, die im Rahmen der Apoptose entstehen. Die stärkste Ausprägung von PARP fand sich in kombiniert mit CTLA-4Ig und DA-Splenozyten vorbehandelten Tieren. Weiterhin waren PARP-Produkte in allen mit CTLA-4Ig nachbehandelten Tieren mit oder ohne Zellapplikation nachweisbar. Kontrolltiere ohne eine weitere Therapie zeigten initial am 6. POD keine Ausprägung von

PARP-Produkten im Western-Blot. Am Tag 12 waren die PARP-Produkte in dieser Gruppe ausgeprägt vorhanden.

Tabelle 18: Nachweis von PARP-Produkten in den transplantierten Lebern. Ausgeprägter Nachweis von PARP fand sich am 12. POD zum einen im Rahmen der fortgeschrittenen Abstoßung in den Gruppen 1.1, 1.2, 2.1, 3.1 und 3.2, die alle im Rahmen der Abstoßung verstarben. Früh am 6. POD war der PARP-Nachweis ausgeprägt bei Empfängern, die mit CTLA-4Ig und DA-Splenozyten vorbehandelt wurden. Am 6. POD nach ORLT fand sich kein Apoptose-Nachweis in der Kontrollgruppe. In jeder Gruppe wurden 3 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet.

Gruppe	Therapie*	Tag 6	Tag 12	Langzeit
	<i>Vorbehandlung</i>			
1.1	DA-Zellen	- / - / +	- / + / +	+ / + / ++
1.2	BN-Zellen	- / + / +		++ / ++ / ++
1.3	CTLA-4Ig	+ / + / ++	- / + / +	- / - / +
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	++ / ++ / ++	++ / ++ / ++	- / - / +
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	- / - / +	+ / + / +	- / - / +
	<i>Synchrone Behandlung</i>			
2.1	Kontrolle	- / - / +		++ / ++ / ++
2.2	CTLA-4Ig	+ / + / ++	+ / + / ++	- / - / +
	<i>Nachbehandlung</i>			
3.1	DA-Zellen	- / + / +		+ / + / +
3.2	BN-Zellen	- / - / +		+ / + / ++
3.3	CTLA-4Ig	- / + / +	- / + / +	+ / ++ / ++
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+ / ++ / ++	- / + / +	- / + / +
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	- / + / +	- / - / +	- / - / +

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie, und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

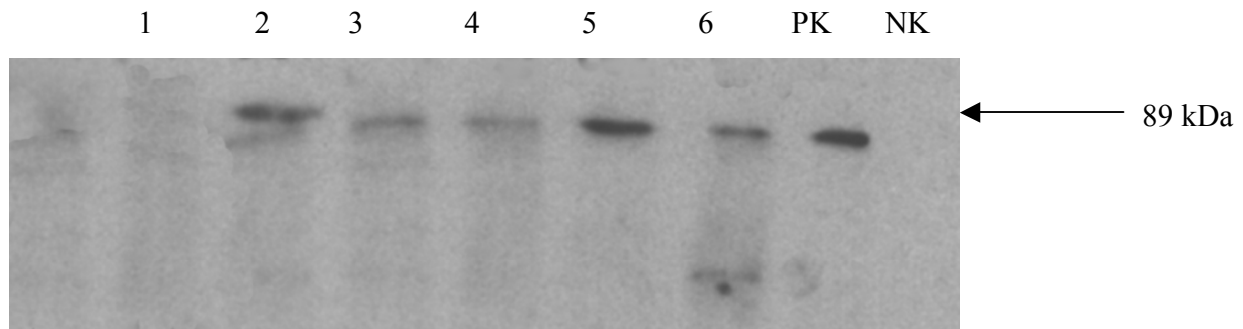


Abbildung 50: PARP-Western-Blot im Lebergewebe nach allogener ORLT. InHöhe der 89 kDa fanden sich keine Apoptosezeichen im PARP-Western-Blot beim Kontrolltier am Tag 6 (1). Banden stellten sich bei mit CTLA-4Ig und DA-Zellen behandelten Tieren am Tag 6 (2) und Tag 12 (3) dar. Auch Langzeittiere dieser Gruppe zeigten Banden nach mehr als 150 Tagen (4) nach ORLT. Nachbehandelte Tiere mit CTLA-4Ig und DA-Zellen zeigten ebenfalls PARP-Produkte am Tag 6 (5) und im Langzeitverlauf (6). PK stellte die Positivkontrolle und NK die Negativkontrolle dar.

C.3.2 In-situ-Apoptose-Detektion

Der in-situ Nachweis apoptotischer Zellen in der Leber bestätigte die Ergebnisse des Western-Blot, die zeigten, daß die Kontrollen früh nach Transplantation keine Apoptose aufwiesen. Die stärkste Ausprägung fand sich wiederum bei den mit CTLA-4Ig und Zellen behandelten Ratten, die schon am 6. POD nach ORLT apoptotische Zellkerne zeigten.

Tabelle 19: Nachweis von apoptotischen Zellen mittels in-situ-Detektion in der Leber nach allogener ORLT. In jeder Gruppe wurden 2 Tiere untersucht und semiquantitativ ausgewertet (- keine, + wenig, ++ mittel, +++ viel Farbintensität).

Gruppe	Therapie	Tag 6	Tag 12
	<i>Vorbehandlung</i>		
1.1	DA-Zellen	- / -	+ / +
1.2	BN-Zellen	- / +	+ / +
1.3	CTLA-4Ig	- / +	+ / ++
1.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	+ / ++	+ / ++
1.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	- / +	+ / ++
	<i>Synchrone Behandlung</i>		
2.1	Kontrolle	- / -	+ / ++
2.2	CTLA-4Ig	- / +	+ / ++
	<i>Nachbehandlung</i>		
3.1	DA-Zellen	+ / +	- / +
3.2	BN-Zellen	- / +	+ / ++
3.3	CTLA-4Ig	- / +	- / +
3.4	CTLA-4Ig und DA-Zellen	- / +	+ / +
3.5	CTLA-4Ig und BN-Zellen	- / +	+ / ++

* Die Vorbehandlung in den Gruppen 1.1-1.5 erfolgte jeweils mit 4-maliger Gabe von CTLA-4Ig (0,5 mg CTLA-4Ig i.p.) und 2-maliger Gabe von allogenen Spenderzellen ($2,5 \times 10^8$ Milzzellen) in der Woche vor ORLT. Gruppe 2.1 erhielt keine Therapie, und Gruppe 2.2 wurde mit CTLA-4Ig an den Tagen 0,1,2,4 und 7 nach ORLT behandelt. Die Gruppen 3.1-3.5 erhielten CTLA-4Ig an den Tagen 3 und 4 sowie allogene Milzzellen am Tag 4 nach ORLT. Dies erfolgte in gleicher Dosierung wie in den Gruppen 1.1-1.5.

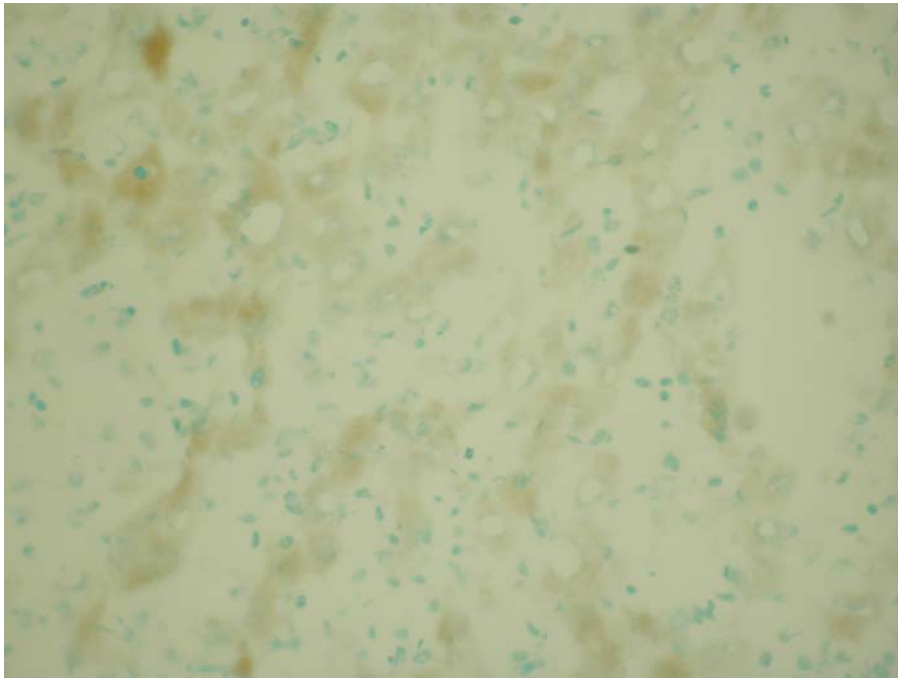
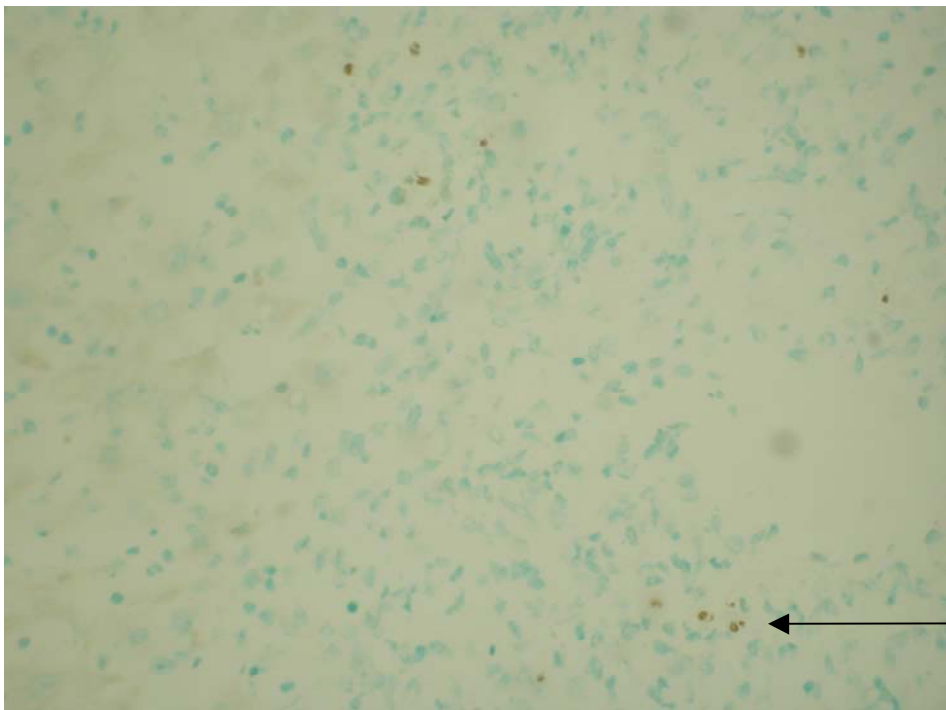


Abbildung 51: (Vergrößerung x40) In-situ-Apoptose-Detektion eines Kontrolltieres am 6. POD nach allogener ORLT ohne weitere Therapie, das keine apoptotischen Zellen im Lebergewebe aufwies.



Apoptotische
Zellen

Abbildung 52: (Vergrößerung x40) In-situ-Apoptose-Detektion am 6. POD eines Tieres der Gruppe 1.4 mit CTLA-4Ig und Applikation von DA-Milzzellen vor allogener ORLT. Bei diesem Präparat fanden sich diffus verteilt apoptotische Zellen im Lebergewebe.

V. Beantwortung der Fragen:

1. *Führt die mehrfache Gabe von Spenderantigen innerhalb einer Woche vor der Transplantation zu einer Verzögerung der Immunantwort des Empfängers nach ORLT?*

Die Applikation von DA-Splenozyten am Tag 7 und Tag 2 vor der ORLT führte zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens auf 18 Tage gegenüber 10 Tagen in der Kontrollgruppe ohne Applikation von DA-Splenozyten vor der Transplantation. Dieses Ergebnis ließ sich nur durch die Gabe von spenderabgeleiteten Milzzellen und nicht durch die Applikation von nicht spenderabgeleiteten Milzzellen erreichen (medianes Überleben 11 Tage) .

2. *Können die Effekte der Vorbehandlung mit spenderabgeleiteten Zellen vor ORLT durch die synchrone Therapie mit CTLA-4Ig verbessert werden?*

Die synchrone CTLA-4Ig-Therapie zu der Applikation von spenderabgeleiteten Milzzellen führte zu einem langfristigem Überleben > 150 Tage aller Organempfänger. Gleichzeitig zeigten die Tiere in den histologischen Präparaten keine Anzeichen von chronischen immunologischen Komplikation, so daß der Effekt des adoptiven Transfers spenderspezifischer Zellen signifikant durch die zeitgleiche Applikation von CTLA-4Ig verbessert wurde.

3. *Ist dieser Effekt spenderspezifisch?*

Sowohl die alleinige Therapie mit CTLA-4Ig vor der ORLT als auch die Therapie mit CTLA-4Ig und BN-Splenozyten verbesserten das Überleben auf > 150 Tage nach ORLT. Allerdings verstarben in beiden Gruppen 3/7 Tieren an immunologischen Komplikationen. Dies zeigt, daß der Effekt der alleinigen CTLA-4Ig-Therapie nur durch spenderabgeleitete Applikation von Milzzellen, wo kein Tier verstarb, und nicht durch die Gabe von nicht spenderabgeleiteten Zellen verbessert werden kann.

4. Ist die mehrfache zusätzliche Applikation von spenderabgeleitetem Antigen nach Transplantation in der Lage, die Immunantwort des Empfängers nach ORLT zu verzögern?

Das Überleben der Ratten, die nach der Transplantation mehrfach spenderabgeleitete Zellen erhielten, war mit 10 Tagen unverändert gegenüber unbehandelten Kontrolltieren.

5. Können die immunsuppressiven Effekte von CTLA-4Ig durch zusätzliche Gabe von spenderabgeleitetem Antigen nach ORLT verbessert werden? Sind diese Effekte antigen-spezifisch?

Bei Therapiebeginn mit CTLA-4Ig am Tag 3 nach der Transplantation wurde das Überleben durch die zusätzliche Applikation von spenderabgeleiteten Splenozyten (Überleben 7/7 Ratten > 150 Tage) gegenüber den nur mit CTLA-4Ig behandelten Tieren signifikant verbessert (Überleben 2/7 Ratten > 150 Tage). Auch die zusätzliche Therapie mit BN-Splenozyten zeigte bei der Behandlung nach ORLT in der Tendenz ein verbessertes Überleben (30 Tage versus 150 Tage). Dieses Ergebnis war nicht statistisch signifikant.

6. Ist es möglich, mit einer CTLA-4Ig-Monotherapie nach ORLT eine Langzeittransplantatakzeptanz zu erreichen?

Die 5-malige Applikation von CTLA-4Ig innerhalb der ersten Woche nach ORLT im Model DA- auf Lewis-Ratten führte regelhaft zu einer dauerhaften Transplantatakzeptanz. Dieses Ergebnis ließ sich ausschließlich erreichen, wenn die Applikation von CTLA-4Ig direkt postoperativ begonnen wurde. Tiere, die am Tag 3 und 4 nach ORLT behandelt wurden, zeigten zwar ein deutlich verbessertes Organüberleben gegenüber unbehandelten Kontrollen, aber nur in 2/7 Ratten eine längerfristige Transplantatakzeptanz.

VI. Diskussion:

A. Toleranzinduktion nach experimenteller Organtransplantation

A.1 Lokalisation und Mechanismen der Toleranz

Das Erzielen einer „Nichtreaktivität“ gegen ein Transplantat ohne kontinuierliche immunsuppressive Therapie bleibt das Ziel der Toleranzforschung (Lechler and Bluestone 1997). Toleranz ist ein Status einer antigen-spezifischen Nichtreaktivität, die durch vorherige Exposition des toleranten Organismus gegen das betreffende Antigen (Tolerogen), z.B. im unreifen Organismus oder durch medikamentöse Therapie, induziert wird und stellt damit das Gegenteil zur Immunität dar. Die Toleranz gegen Eigenantigene zum Beispiel ist eine fundamentale Eigenschaft des Immunsystems, bei deren Verlust es zu Autoimmunerkrankungen kommt. Das Gegenteil des „Tolerogen“ ist das „Immunogen“, welches eine Immunantwort bewirkt. Nahezu jedes Fremdanigen kann alternativ „Tolerogen“ oder „Immunogen“ sein. Dieses hängt unter anderem von der Abreichungsform, der Dosis und der physikalischen Form ab. Die Mechanismen, die zu einer antigen-induzierten spezifischen Inaktivierung der Lymphozyten führen, sind nicht vollständig geklärt. Bei der Allotransplantatabstoßung kommt es zu einer komplizierten Interaktion verschiedener Zelltypen und löslicher Faktoren wie Zytokinen, die letztlich auf die Wirkung immunologisch aktivierter T-Zellen zurückzuführen ist. Da die Ausschaltung der T-Zellaktivierung in vielen Modellen zur Induktion von Toleranz ausreichend ist, fokussiert die Toleranzforschung auf Mechanismen, die zur Aktivierung von T-Zellen beitragen (Knoop, Neumann et al. 1995).

Toleranz von T-Zellen wird je nach Lokalisation der Entstehung in eine zentrale und eine periphere Toleranz eingeteilt, die durch zwei verschiedene T-Zellpopulationen im Thymus bzw. in peripheren lymphatischen Geweben wie Lymphknoten, Milz sowie Blut gekennzeichnet ist (Abb.52).

Die zentrale Toleranz mit dem Mechanismus der klonalen Deletion (Kappler, Roehm et al. 1987) und Anergie von alloreaktiven Zellen als Form der Selbsttoleranz (Roberts, Sharrow et al. 1990) tritt vornehmlich während der Ontogenese im Thymus als sogenannte neonatale Toleranz auf. Eine Negativ-Selektion während der Thymusentwicklung verhindert die Reifung selbst-reaktiver T-Zellen aus unreifen Vorläuferzellen. Mit der Erkennung von

Selbst-Antigen, das vorzugsweise von Knochenmark-Stroma-Zellen oder reaktiven Thymozyten präsentiert wird, unterlaufen die T-Zellen einen programmierten Zelltod (Apoptose)(Nagata 1997). Alternativ können diese Zellen eine klonale T-Zell-Anergie entwickeln, was bedeutet, daß sie bei erneuter Präsentation des Antigens nicht proliferieren. Trotz dieser zentralen Selektionsmechanismen treten unter den peripheren Lymphozyten immer wieder selbst-reaktive Lymphozyten auf, die potentiell einen Schaden an eigenem Gewebe verursachen können und erst peripher die Toleranz gegenüber eigenem Gewebe entwickeln. Dieser Mechanismus, der sich gegen extrathymisch exprimierte Antigene richtet, wird als hauptsächlicher Mechanismus bei der Entstehung von Transplantationstoleranz angesehen (Miller and Morahan 1992).

Insgesamt 6 verschiedene Mechanismen werden als Grundlage für die Entwicklung der peripheren T-Zell-Toleranz betrachtet: 1) Anergie; 2) Regulation; 3) Deletion; 4) Erschöpfung; 5) Ignoranz; 6) Sequestrierung.

Anergie bezeichnet den funktionellen Status der Minderreaktivität von T-Lymphozyten gegenüber einem Antigen. Dies bedeutet, daß T-Lymphozyten nach TCR-Bindung mit dem Antigen weder proliferieren noch IL-2 produzieren (Maier and Greene 1998). Diese Form der T-Zell-Toleranz tritt auf, wenn Antigen/MHC-Komplexe erkannt werden, aber ein geeignetes co-stimulatorisches Signal der T-Zelle ausbleibt (Bindung von CD28 (Boussiotis, Freeman et al. 1993) oder CD154 (Hollander, Castigli et al. 1996)). Durch die Abwesenheit des 2. Signals kommt es zu einem funktionellen T-Zell-Defekt, der eine komplette oder partielle Blockade der IL-2-Genexpression miteinschließt. Dies führt dazu, daß eine Aktivierung der anergen T-Zelle auch nach mehrfacher Antigenexposition nicht auftritt und in-vivo anerge CD4⁺-Zellen durch Blockade von B7:CD28 resistent gegenüber der exogenen Stimulation mit IL-2 sind. Die Dauer einer klonalen T-Zell-Anergie ist zur Zeit nicht geklärt.

Aktive Regulation, die durch T-Zellen oder lösliche T-Zell-Faktoren vermittelt wird, ist ein weiterer Mechanismus zur Toleranzentwicklung, dem in der Transplantationsimmunologie eine große Rolle zugeschrieben wird. Obwohl sich das Klonen oder die Isolation von regulatorischen T-Zell-Subtypen in der Vergangenheit als schwierig gestaltet hat, wurde 1997 ein CD4⁺ T-Zell-Klon, der die Eigenschaften einer regulatorischen T-Zelle hatte, beschrieben. Diese Zellen produzierten nur geringe Mengen von IL-2, große Mengen IL-12 und kein IL-4 (Groux, O'Garra et al. 1997). In-vitro führte dies zu einer Unterdrückung der antigenspezifischen T-Zellaktivierung und zu einer Verminderung der pathologischen Immunantwort.

Deletion bezeichnet im Gegensatz zur Anergie den Zelltod von T-Lymphozyten, und ist nicht nur eine Eigenschaft der Selektion im Thymus, sondern tritt auch peripher auf und führt dort zur T-Zell-Toleranz (Webb, Morris et al. 1990) (Li, Li et al. 1999).

Die wiederholte Exposition eines persistierenden Antigens kann durch eine klonale Erschöpfung als 4. Mechanismus zur Toleranzinduktion führen (Moskophidis, Lechner et al. 1993; Rocha, Grandien et al. 1995) und ist unabhängig von der T-Zell-Anergie. Dieser durch wiederholte Aktivierung induzierte Zelltod wird durch den Zelloberflächenmarker und Signaltransduktion von Fas:Fas Ligand (CD95:CD95L) oder durch die Produktion großer Mengen TNF- α vermittelt.

Bei der Ignoranz persistieren T-Zellen mit einem selbst-reaktiven TCR, ohne anerg zu werden, und proliferieren normal, wenn es ex-vivo zum Kontakt mit demselben Antigen durch eine andere APC kommt (Ohashi, Oehen et al. 1991). Als letztes führt die physikalische Sequestration von Antigen in einem definierten anatomischen Kompartiment, in welchem sich üblicherweise keine lymphoiden Zellen befinden, nicht zur Aktivierung der Immunantwort (Pattison and Krensky 1997).

Klonale Ignoranz und Sequestration sind strenggenommen keine eigenen Mechanismen bei der Entwicklung der peripheren T-Zell-Toleranz, da keiner der beiden eine spezifische Nichtreaktivität gegenüber dem Antigen induziert.

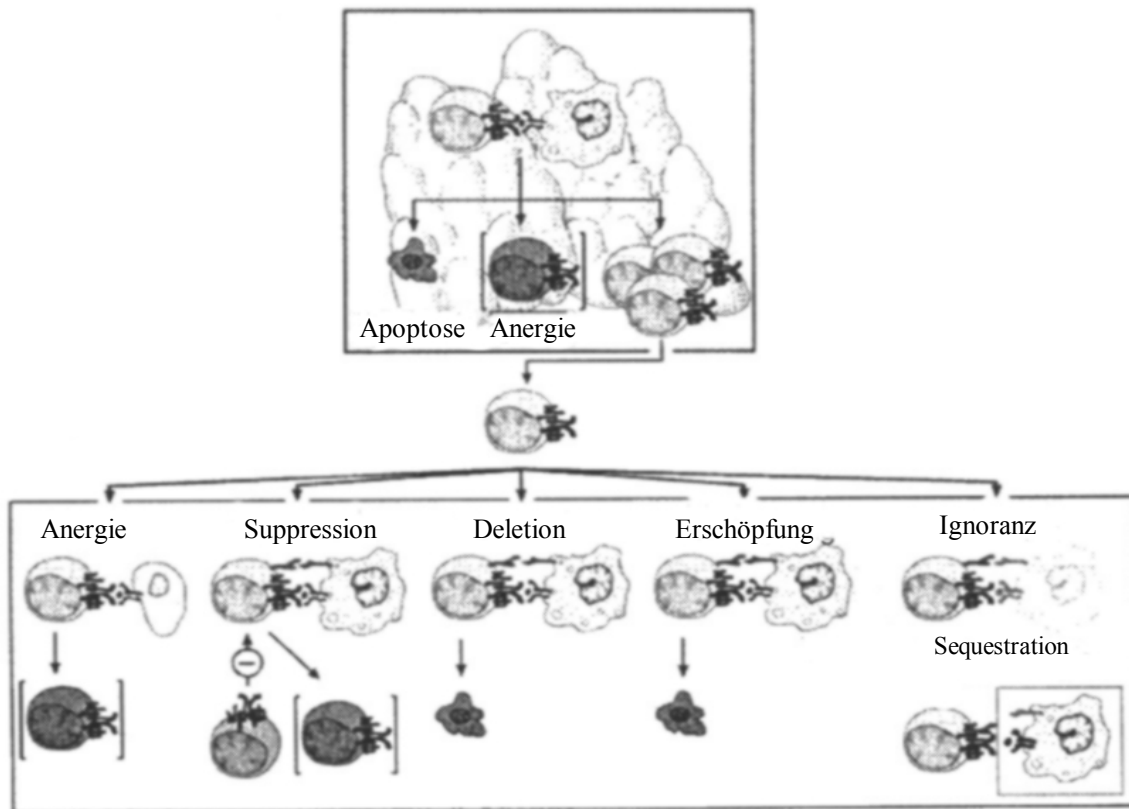


Abbildung 53: Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranzentwicklung der T-Zellen (modifiziert nach (Hollander, Zuklys et al. 1999)).

A.2 Methoden und klinische Entwicklung der Toleranzinduktion

Die Induktion einer Toleranz zu wissenschaftlichen oder therapeutischen Zwecken ist durch eine Vielzahl von Manipulationen mit resultierender Hyporeaktivität und Langzeitüberleben möglich. Diese Aussage ist nicht nur für die Leber, sondern auch für andere primär vaskularisierte Allotransplantate wie Niere, Dünndarm oder Herz gültig.

Durch Transfusion von hämatopoetischen Zellen oder Stammzellen, kombiniert mit Bestrahlung und medikamentöser depletierender Vorbehandlung des prospektiven Organempfängers, kann eine spenderspezifische Nichtreaktivität in-vitro oder in-vivo mit Akzeptanz von konsekutiv übertragenen Organen vom Spendertyp erreicht werden (Strober, Dhillon et al. 1989). Diese Form stellt eine stabile Form der Toleranz dar und hat den Vorteil gegenüber anderen Methoden, daß ein Monitoring über die Messung des Makrochimärismus möglich ist. Nachteile sind die aus der Knochenmarktransplantation bekannten Komplikationen wie Infektionen. Weiterhin sind die langfristigen Folgen der Therapie zur

Zeit unzureichend beschrieben. Diese Protokolle sind bis jetzt nur bei Spender/Empfänger-Paaren (Geschwister) durchgeführt worden die „minor-MHC-Inkompatibilitäten“ aufwiesen. In anderen Studien wurde keine Bestrahlung, sondern mono- und polyklonale Antikörper verwendet, um den größten Teil der Empfänger-Lymphozyten zu entfernen und Raum für die zu transplantierenden Knochenmarkzellen zu schaffen (Monaco 1999).

Der vielversprechendste Ansatz ohne additive Transplantation von Stammzellen, der auch in klinischen Studien erprobt wird, ist die Depletion von T-Zellen mit Campath-1H (anti-CD52)(Waldmann 1991). Dies führt zu einem Verlust des immunologischen Gedächtnisses. Diese Rückführung des Immunsystems des Organempfängers auf einen ontogenetisch früheren, unreifen Status führt dazu, daß Spenderalloantigene im Prozeß der Neuetablierung der Immunkompetenz als eigene Moleküle erkannt und toleriert werden. Dieses Konzept geht mit der Etablierung eines neuen Immunsystems einher.

Toleranzinduktion ohne vollständige Depletion des gesamten immunologischen Gedächtnisses des Empfängers wurde in verschiedenen Großtiermodellen durch die Applikation depletierender oder nicht-depletierender monoklonaler Antikörper erreicht. Seit 1985 wächst die Anzahl monoklonaler Antikörper rasant an, und gesicherte Ergebnisse zur toleranzinduzierenden Wirkung liegen unter anderem für CD4, CD11a, CD28 und CD40L vor (Isobe, Yagita et al. 1992; Waldmann and Cobbold 1998; Hollander, Zuklys et al. 1999). Die Kombination der verschiedenen Antikörper kann die Effizienz einer Monotherapie zusätzlich verbessern. In welcher Weise es durch die sehr verschiedenen monoklonalen Antikörper zur Toleranzinduktion kommt, ist unklar. Wahrscheinlich ist, daß der Antikörper für einen definierten Zeitraum die Abstoßungsreaktion verhindert, wobei die Interaktion von APC und T-Zelle nicht alteriert ist. So entsteht eine Induktionsphase, die eine Toleranzentwicklung gegenüber einem spezifischen Antigen ermöglicht (Waldmann and Cobbold 1998).

In der klinischen Untersuchung ist zur Zeit das CTLA-4Ig, welches das co-stimulatorische Signal, das zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle notwendig ist, blockiert. In den letzten Jahren sind neue Mitglieder dieser B7-Liganden-Familie entdeckt worden, und die Zahl der co-stimulatorischen Moleküle wächst weiter. Viele dieser B7-Liganden binden an CD28 aktivierende (CD28) und inhibitorische (CTLA-4) Rezeptoren (Salomon and Bluestone 1996). Diese Rezeptoren reagieren nicht unabhängig, sondern folgen dem 1. Signal der T-Zellaktivierung mit Bindung des antigen-spezifischen TCR auf T-Zellen. Der CD28-Rezeptor wird konstitutiv auf T-Zellen exprimiert. Die Bindung des CD28 durch entweder B7-1- oder B7-2-Liganden auf den APC stellt ein potentes co-stimulatorisches Signal für die durch den TCR aktivierte T-Zellen dar (Azuma, Ito et al. 1993; Guinan, Gribben et al. 1994; Hollander,

Zuklys et al. 1999). Anschließend erfolgt die IL-2-Transkription und Expression von CD25 auf T-Zellen (Hollander, Zuklys et al. 1999). Zusätzlich wird die TH-1/TH-2 Zytokinantwort durch CD28/B7 Co-Stimulation reguliert. In-vitro werden in Abwesenheit von CD28 keine TH-2 Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10) produziert, während die Produktion von Interferon-gamma konstant bleibt (Rulifson, Sperling et al. 1997; Schweitzer and Sharpe 1999). Ein weiterer, für die Transplantationsimmunologie relevanter Mechanismus ist die Verlängerung des Überlebens von aktivierten T-Zellen durch CD28, das mittels eines Bcl-X_L-abhängigen Mechanismus` die Apoptose aktivierter T-Zellen reduziert (Boise, Minn et al. 1995; Abbas 1996).

B. Toleranzinduktion nach Lebertransplantation

B.1 Sonderrolle der Leber in der Transplantationsimmunologie

Die immunologischen Besonderheiten und die schwächere Abstoßungsreaktion nach orthotoper Lebertransplantation sind erstmalig durch Garnier et al. (Garnier, Clot et al. 1965) und Calne et al. (Calne, White et al. 1967) (Calne, White et al. 1967) im Großtiermodell am Schwein aufgedeckt worden. Garnier et al. fanden ein spontanes Überleben von Leberempfängern, die ein Organ von einem genetisch differenten Spenderschwein erhalten hatten (Garnier, Clot et al. 1965). Calne und Mitarbeiter erhoben gleichartige Befunde nach hetero- und orthotoper Schweinelebertransplantation und konnten darüber hinaus zeigen, daß Haut-, Nieren- und Herztransplantate vom gleichen Spender nicht oder verzögert abgestoßen wurden (Calne, Sells et al. 1969). Auch in anderen Spezies ist diese Hyporeaktivität gegen allogene Lebertransplantate gefunden worden (Kamada, Sumimoto et al. 1988; Kamada, Teramoto et al. 1988).

Diese Ergebnisse konnten im mikrochirurgischen Modell der Rattenlebertransplantation bestätigt und weiter auf zellulärer und humoraler Ebene analysiert werden. Für das Studium immunologischer Mechanismen nach Lebertransplantation hat sich die Spezies Ratte als Standardversuchstier aus verschiedenen Gründen etabliert. Anders als im Großtier gibt es Hunderte rückgezüchteter, genetisch definierter MHC-Typen, die eine gezielte Auswahl der Spender/Empfänger-Kombination mit Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in größeren Gruppenzahlen erlauben.

B.2 Physiologische Ursachen des immunologischen Sonderstatus der Leber

Die Fähigkeit von Lebertransplantaten, in verschiedenen Spezies durch immunologische Manipulationen oder Immunsuppressiva vor akuter Rejektion geschützt zu werden, hat dazu geführt, der Leber einen immunologisch privilegierten Status zuzuschreiben. Weitere privilegierte Kompartimente des Körpers sind die Augenvorderkammer, die Cornea und das Gehirn, da auch hier selten akute Rejektionen auftreten, was vermutlich im Sinne einer Sequestration bei fehlender oder anomaler Lymphdrainage zu erklären ist. Die Leber nimmt eine wichtige Stellung bei der Toleranzinduktion auch für andere Organtransplantate ein. Die partielle Resistenz gegen eine immunologisch verursachte Organdestruktion läßt sich durch anatomische und physiologische Besonderheiten der Leber erklären. Hepatozyten erhalten eine duale Blutversorgung über Arterie und Pfortader in den Sinusoiden, während Parenchymzellen anderer Organe von terminalen Gefäßen versorgt werden. Da das vaskuläre Endothel ein Hauptziel der Rejektionsmechanismen darstellt, ist die verminderte Resistenz von Organen mit einer Mikrozirkulation vom terminalen Typ plausibel (Adams, Wang et al. 1989). Das Gallengangsepithel hingegen wird auch in der Leber von terminalen Arteriolen versorgt und ist besonderer Angriffspunkt für akute und chronische Rejektionen. Die Architektur der Mikrozirkulation ist neben der Expression von MHC-Klasse II-Antigenen eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen. Die hohe physiologische Leistungsfähigkeit und Regenerationsmöglichkeit der Hepatozyten, die immunsuppressiven Eigenschaften von Mediatoren im Zytosol der Hepatozyten (Bumgardner, Billiar et al. 1989), die große Anzahl mit der Leber transplanterter Lymphozyten (Starzl, Demetris et al. 1992; Schlitt, Raddatz et al. 1993) und die Interaktion des von der Leber synthetisierten Akutphaseproteins α_2 -Makroglobulin mit Zytokinen während der Immunreaktionen (Schlitt, Raddatz et al. 1993) sind weitere mögliche Mechanismen der relativen Resistenz der Leber gegen Abstoßung. Der primäre Kontakt mit den, über die Pfortader angefluteten Alloantigenen aus dem Gastrointestinaltrakt spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, was sich dadurch zeigt, daß Toleranz durch orale Gabe von Antigenen erworben werden kann (Callery, Kamei et al. 1990; Kamei, Callery et al. 1990).

B.3 Toleranz nach orthotoper Rattenlebertransplantation

In voll allogenen Rattenstammkombinationen ist eine spontane Akzeptanz des Lebertransplantates mit Langzeitüberleben beobachtet worden, während andere Organallotransplantate in derselben Kombination akut abgestoßen werden (Zimmermann, Davies et al. 1984) (Knoop, Neumann et al. 1995). Durch Wahl geeigneter Spender/Empfänger-Kombinationen können gezielt drei Grade der Abstoßung nach Lebertransplantation in der Ratte beobachtet werden: a) akute Rejektion mit einem Überleben von ca. 2 Wochen, b) verzögerte Rejektion mit einem Überleben von 30-50 Tagen und c) stark verlängertes oder permanentes Überleben mit Toleranzentwicklung (Zimmermann, Davies et al. 1984). Der Grad der Transplantatzerstörung ist mit der genetischen Differenz, insbesondere der MHC-Disparität, korreliert worden. Die Tatsache, daß trotz eines gleichen MHC des Empfängers allogene Lebertransplantate vom gleichen Spendertyp teils abgestoßen, teils toleriert werden (Zimmermann, Davies et al. 1984), hat gezeigt, daß sogenannte non-MHC-Antigene zu der Ausbildung einer Abstoßung beitragen. Daneben spielt die immunologische Reaktionslage des Empfängers, die durch "immune response" oder "immune suppression" Gene determiniert wird, bei der Akzeptanz des Lebertransplantates eine Rolle (Sasazuki, Kikuchi et al. 1989). So akzeptieren Rattenstämme mit einer starken Reaktionslage wie Lewis oder BN als "high responder" ein voll allogenes Transplantat nicht, während "low responder"-Stämme wie DA oder PVG ein Transplantat schwach oder gar nicht abstoßen und spontane Toleranz entwickeln.

Im Rahmen der spontanen Toleranzentwicklung kommt es für 4-7 Tage zu einer starken Infiltration des Transplantates mit Empfängerleukozyten, bevor sich eine zelluläre Immunität ausbildet (Ishikura, Tsuchimoto et al. 1987). Dies bestätigte sich auch in unserer vorliegenden Arbeit, bei der langzeitüberlebende Tiere am Tag 6 und 12 nach ORLT das Bild einer ausgeprägten periportal und intraparenchymatösen Infiltration zeigten. Dieses frühe Infiltrat besteht vorwiegend aus lymphoiden Zellen und Makrophagen. In der folgenden Zeit ändert sich dieses Bild, und es kommt zu einer Dominanz mononukleärer und zytotoxischer T-Zellen. Das Ausmaß der Infiltration korreliert dabei nicht mit der Rejektion bzw. der Akzeptanz des Lebertransplantates (Knechtle, Wolfe et al. 1987).

Ein als Mikrochimärismus bezeichneter Mechanismus könnte die Verbindung zwischen der transplantationsinduzierten, peripheren Toleranz und der neonatalen Toleranz herstellen (Starzl, Demetris et al. 1992). Mikrochimärismus bezeichnet einen Zustand, bei dem weniger als 1% spenderspezifischer Zellen im peripheren Blut von Organempfängern nachweisbar

sind. In langzeitüberlebenden Leberempfängern konnten bereits extrahepatisch persistierende Zellen vom Spendertypus nachgewiesen werden. Mit dem Transplantat werden Spenderzellen übertragen, die sich in den immunologischen Kompartimenten des Organempfängers ansiedeln und einen Mikrochimärismus mit immunologischer Hyporeaktivität ausbilden (Murase, Starzl et al. 1995; Sriwatanawongsa, Davies et al. 1995). Bei Besiedlung des Empfängerthymus könnte es zusätzlich zu einer zentralen Toleranz kommen. Die Relevanz des Mikrochimärismus wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Ko et al. konnten nach Herztransplantation in der Ratte zeigen, daß bei Depletion spenderabgeleiteter mittransplantierte Lymphozyten am Tag der Transplantation das Überleben der Transplantate signifikant verkürzt wurde. Sie wiesen damit nochmals die Bedeutung der „passenger leucocytes“ in der Induktionsphase zur Toleranzentwicklung nach. Bei Depletion spenderabgeleiteter Lymphozyten am Tag 18 nach Transplantation wurde das Überleben nicht mehr beeinflusst. (Ko, Deiwick et al. 1999). Auch Yan et al. konnten nach ORLT (PVG⇒Lewis) zeigen, daß das Transplantatüberleben durch die postoperative Applikation von spenderabgeleiteten Lymphozyten von 16 auf > 100 Tage verbessert wurde (Yan, Shastri et al. 2001). Dies bestätigte sich in unseren Versuchen nicht, was wahrscheinlich an dem immunologisch sehr starken Modell (DA⇒Lewis) liegt. Die Nachbehandlung mit spenderabgeleiteten und nicht spenderabgeleiteten Zellen am Tag 0 und 4 führte in unseren Versuchen nicht zur Verlängerung des Überlebens.

Unsere Ergebnisse sind im Einklang mit anderen Arbeiten zum Mikrochimärismus, die zeitgleich Mikrochimärismus und Abstoßungen nachweisen konnten. In unseren Untersuchungen konnten wir immunhistochemisch im Milzgewebe zeigen, daß der Mikrochimärismus am Tag 6 nach ORLT bei gleichzeitiger Behandlung mit Spendersplenozyten und CTLA-4Ig vor der Transplantation ausgeprägter ist als bei Kontrollen. Gleiches gilt für nur mit CTLA-4Ig und CTLA-4Ig und BN-Zellen behandelte Tiere. Auch Kontrolltiere, die nicht behandelt wurden, zeigten am 6. POD trotz ablaufender Abstoßung noch spenderabgeleitete Zellen im Milzgewebe. Am Tag 12 nach ORLT findet man bei Kontrolltieren keine spenderabgeleitete Zellen mehr. Tiergruppen, die regelhaft langfristiges Überleben zeigten, wiesen am Tag 12 noch einen Mikrochimärismus auf, der sich im Langzeitverlauf nach ORLT aber nur noch vereinzelt bei Tieren mit morphologisch unauffälligem Transplantat nachweisen ließ. Im Langzeitverlauf scheint daher der Mikrochimärismus keine bestimmende Größe für das Aufrechterhalten von Toleranz, sondern Folge derselben zu sein.

Eine weitere Möglichkeit der langfristigen Transplantatakzeptanz besteht in der Möglichkeit einer aktiven Suppression durch T-Suppressor-Zellen. Die adoptive Übertragung von immunologisch kompetenten, durch monoklonale Antikörper phänotypisch definierten Zellen auf Empfänger mit einer, durch Ganzkörperbestrahlung reduzierten bzw. aufgehobenen Immunantwort hat zur funktionalen Charakterisierung von T-Zellsubpopulationen entscheidend beigetragen. Die theoretische Prämisse geht von einer gleichen Radiosensitivität der unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen, die an der Transplantatabstoßung beteiligt sind, aus. In verschiedenen allogenen Transplantationsmodellen in der Ratte sind T-Suppressorzellen nachgewiesen worden (Pawelec 1993). Gassel et al. konnten zeigen, daß T-Zellen ($CD5^+$) aus den Milzen spontan langzeitüberlebender BN \Rightarrow Lewis Leberempfänger in der Lage waren, Indikatororgane wie Haut, Nieren und Herzen spenderabgeleitet vor Abstoßungsreaktionen zu schützen (Gassel, Hutchinson et al. 1992). Lymphozyten, die von toleranten Tieren in der gleichen Kombination mittels Ductus thoracicus-Drainage gewonnen und adoptiv übertragen wurden, waren dagegen bei Nierenempfängern nicht suppressiv wirksam. Der adoptive Transfer von CD4 (T-Helfer)- oder CD8 (T-zytotoxisch/suppressor)-Zellen allein brachte in einer früheren Studie, ebenfalls in der high responder BN \Rightarrow Lewis Stammkombination, keinen oder nur einen partiellen immunsuppressiven Effekt, während die gemeinsame Inokulation beider Zelltypen eine immunsuppressive Potenz aufwies, die der unfractionierter T-Zellen entsprach (Gassel, Hutchinson et al. 1989), was die Bedeutung verschiedener T-Zell Populationen nachwies. Engemann et al. zeigten, daß MHC-Subregionen einen Einfluß auf die Induktion von T-Suppressorzellen haben. Spenderabgeleitete T-Suppressorzellen wurden nach Lebertransplantation über eine Klasse I-Barriere, jedoch nicht über eine Klasse II-Barriere induziert (Engemann, Gassel et al. 1989). Der Mechanismus der Suppression ist im Vergleich zu dem von z.B. T-Helferzellen oder zytotoxischen T-Zellen bislang wenig geklärt. Neben einer phänotypischen Charakterisierung von T-Zellsubpopulationen wird eine funktionale Beschreibung von T-Zellen anhand der von ihnen freigesetzten Zytokine verwendet (Pawelec 1993). Die Wirkung von T-Suppressorzellen gemäß dieser Hypothese beruhte auf einer Freisetzung von suppressiv wirkenden Zytokinen wie IL-4 (Martinez, Gibbons et al. 1990), IL-10 (Del-Prete, De-Carli et al. 1993), IL-13 (Minty, Chalon et al. 1993) und TGF- β (Weinberg, Whitham et al. 1992). Diese Zytokine zeigten überwiegend, jedoch nicht ausschließlich, eine suppressive Wirkung. Mögliche Wege zur Klärung dieser Frage bestehen in der direkten Untersuchung der von T-Suppressorzellen liberierten Zytokine, der Wirkung dieser Zytokine auf Transplantatüberlebenszeiten und der Expression dieser Zytokine in toleranten bzw.

abstoßenden Tieren. Zu diesen Themen liegen bislang nur sporadische Untersuchungen vor (Pawelec 1993). 1997 gelang die Kultivierung eines $CD4^+$ T-Zell-Klons, der die Eigenschaften einer regulatorischen T-Zelle hatte. Die Zelle produzierte nur kleine Mengen von IL-2, große Mengen IL-12 und kein IL-4 (Groux, O'Garra et al. 1997). In-vitro unterdrückte diese Zelle die antigen-spezifische T-Zellaktivierung und regulierte die Immunantwort. Miyanari et al. zeigten 1997 im Modell der ORLT, daß nach Vorbehandlung mit spezifischen Bluttransfusionen eine Verlängerung des Transplantatüberlebens erreicht wurde und dies mit dem Auftreten einer $CD45RC^{low}$ -Zelle im Transplantat korrelierte (Miyanari, Yamaguchi et al. 1997). Bereits seit Beginn 1980 wurde CD45 („leucocyte common antigen“) als ein potentieller Marker für die T-Gedächtnis Zelle erachtet (Akbar, Terry et al. 1988). CD45 besteht aus einer Gruppe von Membranglycoproteinen mit einem Molekulargewicht von 180 bis 240 kD, die nur auf reifen und unreifen Leukozyten exprimiert werden. Der Übergang des voll entwickelten $CD4^+CD8^-$ -Thymozyten in die vollgereifte periphere T-Zelle im Hinblick auf die Restriktion von CD45R und die T-Zell-Funktion ist noch nicht vollständig verstanden. Yang und Bell zeigten bei Ratten, daß die Alloreaktivität funktionaler Thymozyten, die aus dem Thyms in die Peripherie auswandern, mit der zyklischen Expression von CD45RC-Isoformen korreliert (Yang and Bell 1992). In der Ratte werden T-Zell-Subtypen anhand der Expression von „high-molecular-weight“ ($CD45RC^{hi}$) and „low-molecular-weight“ ($CD45RC^{low}$)-Isoformen des CD45 identifiziert. Unbehandelte naive Ratten weisen ausschließlich die $CD45RC^{hi}$ -Isoform auf. Erst nach Antigenpräsentation wächst die Zahl der antigen-spezifischen T-Zellen, und $CD45^{low}$ -Isoformen treten auf (Beverley 1990). Erneute Präsentation des spezifischen Antigens induziert $CD45RC^{low}$ -Memory-Zellen zur Regulierung von FAS und reduziert die Produktion von Überlebensgenen wie Bcl-2. Dies sind Veränderungen, die mit einer Zunahme von Apoptose einhergehen, die wir auch in unserer Studie nach Vorbehandlung mit spezifischem Antigen gesehen haben. Diese Effekte könnten zu einer Reduktion allogen aktivierter T-Zellen führen.

Nach ORLT und Vorbehandlung mit Spenderblut konnten bei toleranten Ratten am Tag 7 eine deutlich erhöhte Zahl von $CD45RC^{low}$ -Zellen gefunden werden (Miyanari, Yamaguchi et al. 1997). Dies deutet darauf hin, daß Gedächtniszellen an den Transfusionseffekten beteiligt sind und möglicherweise Apoptose die Endstrecke dieses Mechanismus ist.

In der klinischen Transplantation zeigten sich Korrelationen zwischen der quantifizierbaren Kapazität von T-Suppressor-Zellen, die das Oberflächenmerkmal $CD8^+$ aufwiesen und $CD28^-$ -negativ waren, mit der Aktivierung von co-stimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 auf Spender APC als geeignetes Monitoring für das Auftreten von Abstoßungen, was auf die

Bedeutung co-stimulatorischer Signale bei der Entwicklung von T-Suppressor-Zellen hinweist (Ciubotariu, Vasilescu et al. 2001).

Vor kurzem wurde eine weitere einzigartige periphere T-Zell-Population entdeckt, die essentiell für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz gegenüber gewebespezifischen Antigenen ist. Diese regulatorischen Zellen sind CD25-positiv und synthetisieren kein IL-2. Weitere Merkmale der Zelloberflächenmarker sind niedrige CD45RB- und hohe Mel-14-sowie CD38-Spiegel. Depletion dieser $CD4^+CD25^+$ T-Zellen führt in verschiedenen Modellen zu einer Reihe T-Zell vermittelter autoimmuner Erkrankungen. Versuche, diese Zellen genauer zu charakterisieren, sind noch im Anfangsstadium. In der Transplantationsimmunologie zeigten Taylor et al. 2001, daß nach Induktion von Toleranz durch Blockade co-stimulatorischer Signale diese $CD4^+CD25^+$ T-Zellpopulation notwendig für die Aufrechterhaltung von Akzeptanz gegenüber dem Alloantigen ist (Taylor, Noelle et al. 2001).

C. Effizienz einer CTLA-4Ig-Behandlung und adoptivem Zelltransfer nach ORLT

Das Schicksal des Transplantates entscheidet sich letztendlich dadurch, ob Abstoßungs- oder Toleranzmechanismen dominieren. Im Falle einer 3.-gradigen Abstoßungsperiode mit Hepatozytennekrose stirbt das Empfängertier durch Ausfall der Leberfunktion. Kommt es dagegen zur Entwicklung einer spontanen Toleranz, überlebt das Tier langfristig (Kamada and Calne 1983).

Die Applikation von CTLA-4Ig zur Blockade des co-stimulatorischen Signals wurde bereits in verschiedenen Modellen erfolgreich zur Reduktion von Abstoßungsreaktionen als auch zur Therapie der chronischen Rejektion eingesetzt (Lenschow, Zeng et al. 1992; Akalin, Chandraker et al. 1996; Sayegh and Turka 1998; Kirk, Burkly et al. 1999). Der Einfluß von CTLA-4Ig auf das Überleben nach ORLT wurde nur in einem nicht-arterialisiertem Lebertransplantationsmodell (DA \Rightarrow Lewis) von Tu et al. untersucht (Tu, Rehman et al. 1997). Sie konnten zeigen, daß das Überleben nach ORLT durch die Gabe von CTLA-4Ig an dem Tag 0 von 11,5 Tagen auf 37,5 Tage verlängert wurde. Die einzelne Gabe von CTLA-4Ig am Tag 4 hatte keinen Einfluß auf das Überleben, während die 3-fache Gabe von CTLA-4Ig an den Tagen 0, 4 und 7 das Überleben auf 98 Tage verlängerte. Ein langfristiges Überleben der Empfängertiere konnte in diesem Versuch durch die Gabe von CTLA-4Ig nicht erreicht werden. Diese Überlebensdaten entsprechen nicht unseren Erfahrungen mit der Behandlung

mit CTLA-4Ig nach ORLT. Unsere Versuche zeigten, daß die 5-malige CTLA-4Ig-Behandlung ab dem Tag 0 regelhaft zu einem langfristigen Überleben der Empfänger führte. Dies läßt sich nur bedingt durch die unterschiedliche Dosierung des CTLA-4Ig erklären, da die Halbwertszeit des Präparates deutlich über 20 Tagen liegt. Des weiteren konnten wir durch die verzögerte Applikation von CTLA-4Ig am Tag 3 und 4 nach ORLT ein deutlich verlängertes Überleben von 10 auf 30 Tage erreichen. Eine mögliche Erklärung für diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse ist, daß in unserer Untersuchung ein arterialisiertes Lebertransplantationsmodell benutzt wurde. Unsere Daten hinsichtlich einer alleinigen Vorbehandlung mit Spenderzellen entsprechen denen anderer Autoren, die ebenfalls ein verlängertes Überleben, aber keine Toleranzinduktion durch die Gabe von spenderabgeleiteten Zellen erreichen konnten (Sato, Yabuki et al. 1996). Die zusätzliche Applikation von CTLA-4Ig zu spenderabgeleiteten Zellen führte sowohl bei der Vorbehandlung vor ORLT als auch bei der Nachbehandlung an den Tagen 3 und 4 zu einem deutlich verbesserten Organüberleben mit Induktion von Langzeitüberleben von allen Empfängern. Dieses Ergebnis war durch die Applikation von nicht abgeleiteten Drittersplenozyten nicht reproduzierbar. Die Tatsache, daß nicht spenderabgeleitete Transfusionen und CTLA-4Ig nur tendenziell, aber nicht signifikant zu einer Verbesserung des Überleben führen, entspricht den Daten von Lin et al. Dieser beschrieb ein medianes Überleben für unbehandelte herztransplantierte Ratten in der Stammkombination BN \Rightarrow Lewis von 7 Tagen, was sich auf 17 Tage bei Tieren, die nur mit CTLA-4Ig behandelt wurden, verlängerte. In diesem Zusammenhang besteht die Möglichkeit, daß die BN-Zellen als sogenannte Bystander-Zellen die allospezifischen T-Zellen abwehren. Die zusätzliche Applikation von nicht abgeleiteten Zelltransfusionen zu CTLA-4Ig verlängerte das Überleben der Tiere auf 26 Tage im Median. Allerdings ließ sich nur durch die Kombination von CTLA-4Ig und spenderabgeleiteten Transfusionen ein Überleben > 100 Tage bei allen Tieren erreichen (Lin, Bolling et al. 1993).

Die Mechanismen der synergistischen Effekte von spenderabgeleiteten Transfusionen und CTLA-4Ig sind nicht untersucht. Spekulieren läßt sich, daß der Zelltransfer durch eine signifikante Reduktion von CD28-positiven aktivierten T-Zellen im Lebertransplantat zu einer Verstärkung der Blockade co-stimulatorischer Signale führt (Nakagawa, Matsuno et al. 2001). Zusätzlich erfolgt durch die erhöhte Dosis des applizierten Antigens eine Veränderung der Zytokinantwort (Sayegh, Akalin et al. 1995) (Rogers and Croft 2000).

Um die Phänomene, die zur Toleranzinduktion nach Rattenlebertransplantation führen, näher zu beschreiben, hat man versucht, durch den Vergleich des zellulären Infiltrates zwischen

abstoßenden Stammkombinationen und Stammkombinationen mit spontaner Toleranzentwicklung vom Phänotyp der infiltrierenden Zellen auf deren immunologische Funktion zu schließen. Farges et al. konnten im Modell der rearterialisierten ORLT in abstoßenden (DA \Rightarrow Lewis) und toleranzentwickelnden Tieren (Lewis \Rightarrow DA) zeigen, daß der Phänotyp, die in-vitro Proliferationsstimulation durch IL-2 und das spenderabgeleitete zytotoxische Potential transplantatinfiltrierender Zellen, in beiden Gruppen vom Tag 2-6 gleich war (Farges, Morris et al. 1994). Am Tag 7 und 8 zeigte sich eine Reduktion der CD4⁺-Zellen in toleranten Tieren, und eine spenderabgeleitete Zytotoxizität war nicht mehr vorhanden. Da die Destruktion des Transplantates bei abstoßenden Tieren am 3.-4. Tag einsetzte, beide Gruppen jedoch immunologisch gleiche Parameter aufwiesen, schien eine fehlende Reaktivität bei toleranten Tieren nicht für die spontane Akzeptanz verantwortlich zu sein (Farges, Morris et al. 1994). Sun et al. fanden für die gleiche Stammkombination wie Farges et al., jedoch mit einem nicht rearterialisierten Modell, daß die Art der T-Zellen und die Stärke der Zytokinexpression zwischen abstoßenden und toleranten Tieren nicht wesentlich differierte. In toleranten Tieren waren jedoch mehr B-Zellen und in abstoßenden Tieren mehr IgG1-Ablagerungen (Sun, McCaughan et al. 1994). Die Analyse der Zytokinexpression im Lebergewebe von langzeittoleranten Empfängern hat gezeigt, daß es in diesen Tieren zu einer Polarisierung der Zytokinexpression in Richtung des T-Helfer-Zellentypus TH2 mit den Zytokinen IL-4 und IL-10 kommt. TH1-Zellen mit einer Expression von IL-2 und IFN- γ waren dagegen nicht nachweisbar (Egawa, Martinez et al. 1995). Analog dazu waren sowohl in den abstoßenden Allotransplantaten (DA \Rightarrow Lewis) als auch in der Milz IL-2- und IFN- γ -Transskripte spezifisch vorhanden (Egawa, Martinez et al. 1995). Dies entspricht den Daten in unserer Studie, die sowohl in den Lebern als auch in der Milz eine deutlich gesteigerte Expression von CD25 in unbehandelten Tieren zeigte. Allerdings war bei unsern Versuchen sowohl IL-12 β 2 als auch IFN- γ in den behandelten und später toleranten Tieren bei unseren Versuchen früher und stärker hochreguliert. Dies widerspricht der These, daß eine klassische TH1 \Rightarrow TH2-Verschiebung für die gute Effizienz der kombinierten Therapie mit CTLA-4Ig und abgeleiteten Spenderzellen verantwortlich ist und spricht für aktivierungsinduzierte Mechanismen der T-Zellen in der frühen Phase nach ORLT. Möglicherweise führt die Aktivierung der T-Zellen bei fehlendem co-stimulatorischen Signal zur Apoptose derselben. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zur Zytokinexpression in den Studien ist der Zeitpunkt der Untersuchung. In einer Studie zur spontanen Toleranz von Farges et al. (Farges, Morris et al. 1995) konnte dieser zeigen, daß die Expression für mRNA für IL-4 früh bis zu dem Tag 5 abstoßende von toleranten Tieren

differenziert. Am Tag 7 hingegen war die Ausprägung in beiden Gruppen gleich. Unterschiede in der IL-2- und IL-10-Expression fanden sich in dieser Studie nicht. Untersuchungen zu diesen frühen Zeitpunkten wurden bei unseren Versuchen nicht durchgeführt. Unsere Versuche zeigten, daß bei Tieren, die das Transplantat im Langzeitverlauf akzeptierten, initial eine ausgeprägte Expression des TH1-Zytokins IFN- γ vorhanden war. Diese war schnell regredient und am 12. postoperativen Tag geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Im Langzeitverlauf fanden wir in den Transplantaten toleranter Tiere eine vermehrte IL-4- und IL-10-Expression, während die Expression von TH1-Zytokinen vollständig verschwand. Die Zeitabfolge sowie die unterschiedlichen Methoden zur Toleranzinduktion sind mögliche Erklärungen für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse der zur Zeit publizierten Arbeiten zur Bedeutung von TH1-TH2-Zytokinen zur Initialisierung von Toleranz nach Organtransplantation. Weiterhin macht es die These wahrscheinlich, daß es nach einer aktiven Phase, die einen funktionierenden T-Zell-Rezeptor benötigt, zur Ausbildung von Toleranz kommt, bei der im Langzeitverlauf die TH2-Zytokine überwiegen. Regulative T-Zellen haben diese Funktion und exprimieren im wesentlichen IL-4, IL-10, TGF- β und kein IL-2. Dies entspricht genau dem Zytokinprofil in den Transplantaten unserer langzeitüberlebenden Tiere. Zusätzlich konnten im Gewebe der Transplantate mehr als 150 Tage nach ORLT noch CD4⁺CD25⁺ Zellen nachwiesen werden. Da gleichzeitig keine mRNA von IL-2 nachweisbar war, erhärtet dies die These, daß regulatorische T-Zellen für die Aufrechterhaltung der Toleranz verantwortlich sind. Bei der Analyse von Zytokinprofilen in Rattentransplantaten sind noch weitere methodische Aspekte relevant, die die sehr verschiedenen Ergebnisse erklären könnten. Zum einen erfolgt die Messung der TH2-Zytokine aufgrund mangelnder spezifischer Antikörper nahezu in allen Versuchen mittels RT-PCR für spezifische mRNA. Diese Methodik ist meist semiquantitativ, was Ungenauigkeiten beinhaltet. Zum anderen ist es unklar, inwieweit das Auftreten der mRNA mit der biologischen Aktivität der Substanz korreliert. Dies ließe sich nur durch die Messung des korrespondierenden Proteins feststellen. Im weiteren spielt die in den Versuchen variierende absolute Menge des applizierten Antigens sowie der Zeitpunkt der Messung eine Rolle bei der TH1-TH2-Verschiebung. Hieraus resultieren die sehr unterschiedlichen Ergebnisse der TH1 und TH2-Antwort und der Entwicklung von Toleranz nach Organtransplantation (Aroeira, Cardillo et al. 1995; Garside, Steel et al. 1995; Plain, Fava et al. 1997; Wolvers, van-der-Cammen et al. 1997). Tatsächlich kommen ein großer Teil der Studien zur Toleranzentwicklung ganz ohne die humorale Antwort der TH2 Zytokine aus (Cobbold and Waldmann 1998). Daß auch die Stärke der TH1-Antwort nicht nur für den

Verlauf der Abstoßung verantwortlich ist, wurde durch IL-2-Knockout-Mäuse (IL-2^{-/-}) gezeigt, die allogene Pankreasinseln und vaskularisierte Herztransplantate mit der gleichen Geschwindigkeit und Stärke abstoßen wie IL-2-positive Kontrollen. Zusätzlich sind Abstoßungen in IL-4^{-/-} Mäusen nicht verzögert. Nimmt man IL-2^{-/-} und IL-4^{-/-}-Mäuse, so entspricht die immunologische Antwort der von „Wild-type“-Mäusen (Li, Roy-Chaudhury et al. 1998). Dies führte in der Vergangenheit zu Spekulationen, daß ein weiteres Zytokin TGF- β 1 eine Rolle bei der peripheren Toleranzentwicklung spielt. Mäuse mit einem nicht-funktionierendem TGF- β 1-Gen zeigten ein multi-inflammatorisches Krankheitsbild, was auf eine immunregulatorische Wirkung von TGF- β 1 hinweist. Groux et al. haben (Groux, O'Garra et al. 1997) CD4⁺-Klone produziert, welche sich von den typischen TH1-TH2 unterscheiden. Diese CD4⁺-Zellen produzierten IL-10 und TGF- β 1, aber kein IL-4. Die INF- γ -Produktion der Zellen war variabel, aber insgesamt niedrig. Sie wurden von den Autoren mit Tr1 bezeichnet und ähneln CD4⁺-T-Lymphozyten, die TGF- β 1 produzieren und für die Regulation von IgA im Darm mitverantwortlich sind. Diese Tr1-Zellklone verhindern die autoimmune Colitis in der Maus. Zwei Aspekte der Wirkung von TGF- β 1 sind auch in der peripheren Toleranzinduktion von Relevanz. Zum einen, daß diese Tr1-Klone gegen Ovalbumin und nicht gegen das Antigen gerichtet waren und ausschließlich die Entwicklung der Colitis verhinderten, wenn das Tier gleichzeitig mit dem spezifischen Antigen gefüttert wurde. Das spricht dafür, daß sowohl das Ovalbumin als auch das Antigen von der gleichen APC präsentiert werden muß. Zum anderen proliferierten diese Zellen nur wenig, wenn sie mit dem Antigen in Kontakt kamen (Letterio and Roberts 1998). Diese mangelnde Fähigkeit zu proliferieren konnte in anderen Versuchen durch die Gabe von IL-2 oder die Blockade von IL-10 wieder aufgehoben werden (Letterio and Roberts 1998). Die Gabe von IL-10 führte weiterhin bei gleichzeitiger Applikation von Antigen, zu einer spezifischen T-Zell-Anergie (Groux, O'Garra et al. 1997). Umgekehrt schienen anerge CD4⁺-T-Zellen die Fähigkeit zu behalten, IL-10 und TGF- β 1 zu produzieren (Kawai and Ohashi 1995; Buer, Lanoue et al. 1998). Dies ermöglicht die These, das Tr1-vermittelte periphere Toleranz durch eine Form von T-Zell-Anergie vermittelt wird, die sowohl TH1- als auch TH2-Zellen betrifft. Diese attraktive These, die die unterschiedlichen Ergebnisse der TH1-TH2-Antwort erklären könnte, läßt sich im Modell der Rattenlebertransplantation nicht untermauern. Farges et al. zeigten bereits 1995, daß sich die intrahepatische Expression der TGF- β 1 und IL-10 mRNA bei spontaner Toleranz und Abstoßung nach ORLT nicht unterscheiden. Auch in unseren Versuchen konnten wir in der frühen Phase nach ORLT keine Unterschiede für die IL-10-Expression in den verschiedenen Gruppen evaluieren. Interessante neue Studien beschreiben

jetzt die zentrale Rolle von IL-2 und IFN- γ für die Induktion von peripherer Toleranz nach allogener Transplantation. Studien in IFN- γ $-/-$ und IL-2 $-/-$ Mäusen zeigten, daß IFN- γ und IL-2 signifikante immunregulatorische Funktionen haben. Die postoperative Blockade von CD28 und/oder CD40 führt zu einem langfristigen Transplantatüberleben nach Herztransplantation in der Maus. Dieses Ergebnis läßt sich nicht in IFN- γ $-/-$ oder mit anti-IFN- γ behandelten Mäusen reproduzieren, was die Signifikanz von IFN- γ in der Toleranzinduktion unterstreicht (Konieczny, Dai et al. 1998) und möglicherweise auf die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung von IFN- γ zurückzuführen ist. Diese Versuche zeigten die Relevanz der TH1-Antwort nicht nur bei der Initiation, sondern auch bei der Limitation der Abstoßung auf. Für die Effekte von CTLA-4Ig konnten ähnliche Effekte gezeigt werden. CTLA-4Ig hemmt die allogen-induzierte T-Zell-Proliferation in-vitro ausschließlich in der Anwesenheit von IFN- γ (Hassan, Dai et al. 1999). Dieses unterstützt unsere Resultate, bei denen mit CTLA-4Ig und abgeleiteten Zellen vorbehandelte Tiere deutlich mehr IFN- γ mRNA-Transskripte in der Leber aufwiesen als die unbehandelten Kontrollen. Gleiches galt für ab der Transplantation mit CTLA-4Ig behandelte Ratten. Die am 3. und 4. POD nachbehandelten Tiere zeigten erst ab dem 12. postoperativen Tag eine ausgeprägte IFN- γ -Expression auf, was mit dem späten Therapiebeginn ab dem 3. postoperativen Tag zusammenhängen kann. Unsere Ergebnisse korrelieren eng mit neuen Arbeiten zur Toleranzinduktion in Nieren- und Hauttransplantaten, die zeigten, daß Toleranzinduktion ein aktiver Prozeß ist und eine funktionierende T-Zelle erfordert.

Ein in diesem Zusammenhang propagierter Mechanismus, der für die Entwicklung von peripherer Toleranz verantwortlich gemacht wird, ist die T-Zell-Apoptose. Apoptose ist die häufigste Form von Zelltod im Organismus. Sie ist verantwortlich für die Homöostase von Geweben und Beseitigung von alten, verletzten, mutierten oder gefährlichen Zellen. Im Immunsystem ist sie der Hauptmechanismus, über den potentiell autoreaktive T-Zellen vernichtet werden. Durch die negative Selektion findet die Eliminierung von T-Zellen statt, deren TCR mit körpereigenen Peptiden und MHC reagieren und die damit potentiell autoreaktiv sind (Nossal 1994). Auf ähnliche Weise werden im Knochenmark B-Zellen mit einem nicht-funktionellen B-Zell-Rezeptor durch Apoptose beseitigt (Osmond 1993). Auch werden nach dem Gipfel einer Immunantwort aktivierte T-Zellen, die nicht mehr benötigt werden, durch Apoptose eliminiert. Dies wird als aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) bezeichnet. In der Toleranzinduktion erfolgt AICD gehäuft nach wiederholter Antigenpräsentation in CD4⁺-Zellen durch die Expression von Fas und FasL (Brunner, Mogil et al. 1995; Dhein, Walczak et al. 1995). T-Zellen sind die einzige Zellpopulation im Körper,

die AICD unterläuft. Die Relevanz von Fas und FasL und Apoptose zur Regulation autoimmuner Erkrankungen wurde in Mäusen mit Fas- und FasL-Mutationen bewiesen (Nagata and Suda 1995). Ein weiterer Mechanismus zur Regulation des Auftretens und der Frequenz von Apoptose erfolgt durch co-stimulatorische Signale über CD28, was eine relevante Rolle für die konsekutive Entwicklung peripherer Toleranz gegenüber spezifischen Antigenen spielt (Boise, Minn et al. 1995; Van-Parijs, Ibraghimov et al. 1996). Dies erfolgt über die Regulation der Proteine der Bcl-2-Familie, deren Namensgeber ursprünglich das Onkogen bcl-2 war, das als Folge einer chromosomalen Translokation in follikulären B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist. Im Gegensatz zu anderen Onkogenen besteht die Funktion von Bcl-2 nicht darin, Proliferation zu stimulieren, sondern Zellen vor Apoptose zu schützen und somit deren Überleben zu verlängern (Hockenbery, Nunez et al. 1990). Li et al. zeigten, daß Induktion von Apoptose-aktivierter T-Zellen bei der Toleranzinduktion beteiligt ist. Dies gilt für vaskularisierte Transplantate und für Hauttransplantate, welche üblicherweise in allen Toleranzmodellen abgestoßen werden. Man erreichte dies durch Blockade der Co-Stimulation und gleichzeitige Applikation von Rapamycin (Li, Li et al. 1999) (*Abbildung 54*). Dieser toleranzinduzierende Effekt war bei Applikation von Cyclosporin A, welches anti-apoptotische Potenz besitzt, nicht mehr vorhanden. Cyclosporin A inhibiert Apoptose von T-Zellen in verschiedenen Modellen und wirkt damit genau gegenteilig zu anti-CD40 und CTLA-4Ig (Shi, Sahai et al. 1989; Yazdanbakhsh, Choi et al. 1995). Dies führte zum Abbruch einer durch Blockade des co-stimulatorischen Signals induzierten Toleranz in Affen- und Mausmodellen (Kirk, Burkly et al. 1999). Wells et al. belegten ebenfalls die Wertigkeit von Apoptose zur Toleranzinduktion. In den Versuchen wiesen die Autoren nach, daß durch transgene Expression von Bcl-xL, welches T-Zell-Apoptose reduziert, die Toleranzinduktion blockiert wurde. Diese Ergebnisse korrelieren eng mit unseren Versuchen zur Toleranzinduktion nach ORLT mit CTLA-4Ig und adoptivem Zelltransfer. Tolerante Tiere, die mit CTLA-4Ig und spezifischen adoptiven Zellen behandelt wurden, zeigten eine deutlich höhere Apoptoserate als die Kontrollgruppe, und die nur mit CTLA-4Ig oder Zellen behandelten Tiere. Dies ist möglicherweise eine Folge von 2 verschiedenen Mechanismen. Zum einen Verstärkung des AICD durch den wiederholten adoptiven Zelltransfer, der unabhängig von co-stimulatorischen Signalen ist, zum anderen Folge der Reduktion des Überlebensgens Bcl-xL durch die Applikation CTLA-4Ig.

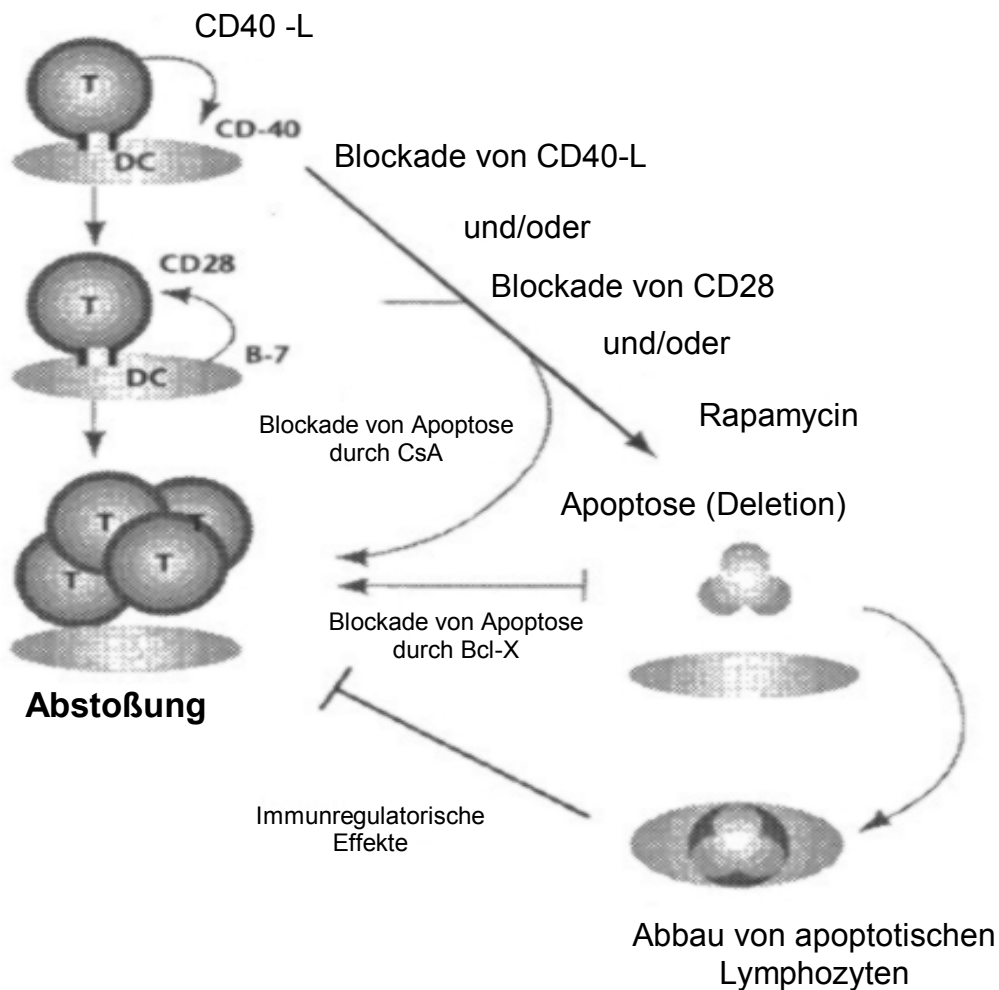
Immunität**Toleranz**

Abbildung 54: Apoptose verstärkt die Transplantatakzeptanz. Transplantatantigene werden durch APC dem TCR präsentiert. Dies führt zur Aktivierung von CD40 auf dendritischen Zellen durch CD40L der T-Zelle, wodurch co-stimulatorische Moleküle auf den T-Zellen exprimiert werden. Die Kombination von TCR-Bindung und Aktivierung der Co-Stimulation resultiert in immunologischer Aktivierung und konsekutiver Transplantatabstoßung. Die Blockade der Co-Stimulation nach erfolgter TCR-Bindung führt zur Apoptose der T-Zelle. Diese Effekte werden durch Rapamycin verstärkt und durch Cyclosporin A aufgehoben. Ebenfalls zum Abbruch von Toleranz kommt es bei Aktivierung von Bcl-xL, das -ähnlich wie Cyclosporin A- Apoptose reduziert (modifiziert nach (Ferguson and Green 1999)).

Es stellt sich anschließend die Frage, wie es nach Abschluß der Therapie zu einer andauernden Akzeptanz des Transplantates kommen kann. Wir konnten zeigen, daß der programmierte Zelltod bei der Induktion von Toleranz nach ORLT eine Rolle spielt. Offen bleibt, warum diese apoptotischen aktivierten T-Zellen nicht einfach durch neue reifende T-Zellen ersetzt werden. Dies wird möglicherweise dadurch erklärt, daß weitere immunregulatorische Effekte durch die Therapie bewirkt werden. Eine Erklärung ist die Entstehung regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Zellpopulationen, die kein IL-2 aber IL-4 exprimieren. Diese These würde durch unsere Versuche unterstützt, bei denen wir in den Transplantaten toleranter Ratten $CD25^+$ -Zellen, keine IL-2 mRNA-Transskripte, jedoch ausgeprägt IL-4 mRNA-Transskripte nachweisen konnten, was dem typischen Zytokinmuster regulatorischer T-Zellen entspricht. Also ist möglicherweise die apoptotische T-Zelle selbst Ausgangspunkt dieses Vorganges.

In der immunologisch privilegierten Lokalisation des Auges konnte nachgewiesen werden, daß der Tod lymphoider Zellen direkt zu einer anti-inflammatorischen Reaktion führte und das systemische Immunsystem hierdurch negativ reguliert wurde. Dies ist möglicherweise eine Folge der Phagozytose apoptotischer Zellen, die mit der Produktion anti-inflammatorischer Zytokine einhergeht (Gao, Herndon et al. 1998). Theoretisch könnte durch diesen Mechanismus nicht nur die Deletion der aktivierten T-Zellen sondern konsekutiv die negative Regulation des Immunsystems durch die tote Zelle, einen maßgeblichen Anteil an der langfristigen Transplantatakzeptanz durch Blockade des co-stimulatorischen Signals und adoptiven Zelltransfer haben.

VII. Zusammenfassung:

Die Überlebensergebnisse in der Organtransplantation haben sich in den letzten 20 Jahren rasant verbessert und liegen bei Nieren- und Lebertransplantationen inzwischen bei über 70% nach 5 Jahren. Diese Ergebnisse ermöglichen zum ersten Mal die Analyse von Langzeitverläufen nach einer Organtransplantation. Hier zeigt sich, daß der langfristige Einsatz der neuen und potenten Immunsuppressiva zu relevanten Nebenwirkungen führt. Diese tragen zur Mortalität und Morbidität transplantierte Patienten im Langzeitverlauf bei und verschlechtern signifikant deren Lebensqualität. Aus diesem Grund sind in den letzten Jahren die Bemühungen intensiviert worden, Transplantatakzeptanz ohne längerfristige immunsuppressive Therapie zu erreichen. Allerdings sind es gerade die guten Überlebensergebnisse mit konventionellen Immunsuppressiva, die die Einführung der zum Teil sehr invasiven Toleranzinduktionsmodelle behindern. Die dazu bisher eingeführten klinischen Modelle arbeiten entweder mit knochenmarkablativen Therapien oder Depletion sämtlicher T-Zellen im Empfänger. Beide Methoden sind zur Zeit noch nicht ausgereift. Die Komplikationen der Knochenmarkablation und synchroner Knochenmarktransplantation sind aus der KMT bekannt. Die Patienten haben extrem hohe Infektrisiken, und die langfristigen Auswirkungen der Therapie sind unzureichend beschrieben. Aus diesem Grund ist nur ein abgeschwächtes Protokoll bei Geschwistern mit „minor MHC“-Inkompatibilitäten in Anwendung. Der 2. Ansatz, also die Depletion der T-Zellen mit monoklonalen Antikörpern wie zum Beispiel Campath 1H, ist allein nicht suffizient, um Abstoßungen zu vermeiden und benötigt zusätzlich die Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren. Diese Protokolle arbeiten auf der Basis, daß durch die medikamentöse Therapie das gesamte immunologische Gedächtnis des Empfängers zerstört wird. Dieses wird anschließend in Anwesenheit des Transplantates neu aufgebaut und beinhaltet möglicherweise auch pathologische Veränderungen, die bei älteren Patienten eher auftreten als beim Embryo. Aus diesem Grund wird weiter an der Entwicklung weniger invasiver Protokolle zur Toleranzinduktion gearbeitet.

Die Blockade des co-stimulatorischen Signals mit CTLA-4Ig hat in verschiedenen tierexperimentellen Modellen seine Wirksamkeit zur Induktion von Toleranz nach Organtransplantation bestätigt und ist bereits für die Therapie der Psoriasis ohne schwerwiegende Nebenwirkungen in der Klinik verwandt worden. Immunogene Großtierversuche haben aber gezeigt, daß die alleinige Applikation von CTLA-4Ig nicht ausreichend ist, um nach einem kurzem Therapieintervall langfristige Transplantatakzeptanz

zu erreichen. Aus diesem Grund evaluierten wir, inwieweit die Behandlung mit CTLA-4Ig, kombiniert mit einem adoptiven Zelltransfer, die Ergebnisse der alleinigen CTLA-4Ig-Behandlung im Modell der Rattenlebertransplantation verbessert. Hierfür wurde das stark immunogene Modell DA-Ratten auf Lewis-Ratten verwendet. Die Ratten erhielten in verschiedenen Gruppen vor/nach der Transplantation CTLA-4Ig oder die Kombination von CTLA-4Ig mit Milzzellen. Hierfür verwendeten wir spenderabgeleitete und nicht spenderabgeleitete Milzzellen.

Bei der alleinigen Vorbehandlung der Empfänger, entweder mit spenderabgeleiteten Zellen oder CTLA-4Ig, ließ sich eine Verbesserung des Transplantatüberlebens, aber keine Langzeitakzeptanz des Transplantates erreichen. Erst die Kombinationstherapie mit Spenderzellen vor der Transplantation gewährleistete ein langfristiges Organüberleben ohne Zeichen für chronische Rejektionen nach mehr als 150 Tagen. Dieses Therapiekonzept eignet sich ausschließlich für Lebendspenden, da die Limitation durch die Ischämiezeit des Organes keine längerfristige Vorbehandlung zuläßt und die Behandlung mit unspezifischen Zellen eines weiteren Spenders die Ergebnisse nicht verbesserten. Beginnt man mit der CTLA-4Ig-Therapie hochdosiert zum Zeitpunkt der Transplantation, so lässt sich durch die längerfristige Behandlung mit CTLA-4Ig auch ein 100%-iges Transplantatüberleben erreichen. Die alleinige Therapie mit spenderabgeleiteten Zellen am Tag der Transplantation oder verzögert nach 4 Tagen nach Transplantation veränderte die Überlebenszahlen dahingegen nicht. Dies zeigt, daß dieses Konzept nicht in der Lage ist, die immunologische Reaktionslage des Empfängers dahingehend zu verändern, daß dieser das Transplantat akzeptiert.

Die verzögerte postoperative Therapie mit CTLA-4Ig, wie sie auch von anderen Gruppen durchgeführt wurde, resultierte in unseren Versuchen in einem verlängertem Überleben, führte aber nur bei 2/7 Tieren zur langfristigen Transplantatakzeptanz. Die zusätzliche Applikation nicht abgeleiteter Milzzellen verbesserte die Ergebnisse nicht signifikant. Transplantatakzeptanz bei allen Tieren ließ sich wiederum nur durch die Kombination spenderabgeleiteter Zellen und CTLA-4Ig erreichen.

Verschiedene, möglicherweise für diese Ergebnisse verantwortliche Mechanismen, wurden untersucht. Spenderabgeleiteter Mikrochimärismus trat bei allen Tieren, also auch bei Kontrolltieren trotz ablaufender Abstoßung am 6. POD nach ORLT auf. Am 12. POD zeigten tolerante Gruppen noch spenderabgeleitete Zellen, wohingegen diese bei abstoßenden Gruppen nicht mehr nachweisbar waren. Im Langzeitverlauf waren diese spenderabgeleiteten Zellen auch in toleranten Tieren nur noch vereinzelt nachzuweisen, was dafür spricht, daß der Mikrochimärismus in der Initialphase relevant ist, aber im Langzeitverlauf eher eine

untergeordnete Rolle bei der Aufrechterhaltung der langfristigen Transplantatakzeptanz spielt. Durch adoptiven Zelltransfer ergaben sich keine Unterschiede in Nachweis von Mikrochimärismus zwischen den Gruppen.

Die These, daß eine Verschiebung der Zytokinantwort von TH1- Richtung TH2-Zytokinen die Akzeptanz des Transplantates fördert, konnte in unseren Untersuchungen zur Toleranzinduktion durch Kombination von CTLA-4Ig-Applikation und adoptivem Zelltransfer nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, die TH1-Antwort mit INF- γ und IL-12 β war bei toleranten, kombiniert mit CTLA-4Ig und adoptivem Zelltransfer behandelten Ratten früher und stärker ausgeprägt, aber schneller wieder rückläufig als bei unbehandelten Kontrollen. Dies galt nicht für IL-2, das in allen Gruppen, die mit CTLA-4Ig behandelt wurden, stark unterdrückt war. Langfristig überlebende Tiere zeigten mehr als 150 Tage nach ORLT nahezu keine Expression dieser TH1-Zytokine mehr, wohingegen IL-4 deutlich exprimiert wurde. Dies spricht gegen eine ausschließliche Verschiebung der Zytokinantwort nach TH2 und betont die Bedeutung von TH1-Zytokinen in der initialen Phase der Toleranzentwicklung.

In toleranten Tieren mit adoptivem Zelltransfer zeigte sich im Vergleich zu abstoßenden Tieren eine stärkere Ausprägung von Apoptose in den Transplantaten, die zeitlich parallel zu der mRNA-Expression der TH1-Zytokine verlief. Dies läßt darauf schließen, daß Apoptose aktivierter T-Zellen der Mechanismus ist, der die additiven Effekte der CTLA-4Ig-Behandlung und des adoptiven Zelltransfers vermittelt.

Hier könnten synergistische Effekte der abgeleiteten Zellapplikation und der CTLA-4Ig-Therapie durch Reduktion von Überlebensgenen, Ausbildung von CD45RC^{low}-Zellen und AICD, die alle zum Tod alloreaktiver aktivierter T-Zellen führen, eine Rolle spielen.

Dies erklärt zwar die Wirksamkeit der Therapie früh nach der Transplantation, kann aber nicht für den Langzeitverlauf verantwortlich sein, da die Therapie zeitlich nur limitiert ist. Jedoch zeigten auch langfristig überlebende Tiere mehr als 150 Tage nach der Lebertransplantation eine vermehrte Apoptoseaktivität. Ein weiterer Mechanismus könnte die Ausprägung regulatorischer T-Zellen sein. In den Transplantaten fanden sich bei langfristig überlebenden Tieren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, wobei die mRNA-Transskripte für IL-2 nicht vorhanden waren. Dahingegen wurden vermehrt die mRNA-Transskripte von IL-4 in den Lebern toleranter Tiere exprimiert, was dem typischen Zytokinprofil regulatorischer T-Zellen entspricht. Schlußfolgernd macht die geringe Invasivität der kombinierten Behandlung mit CTLA-4Ig und spenderabgeleiteten Zellen bei gleichzeitig guter Effizienz das Konzept zu einem neuen vielversprechenden Ansatz in der Klinik.

VIII. Literatur:

- ABBAS, A. K. (1996). "Die and let live: eliminating dangerous lymphocytes." *Cell* **84(5)**: 655-7.
- ABRAMS, J. R., M. G. LEBWOHL, ET AL. (1999). "CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris." *J Clin Invest* **103(9)**: 1243-52.
- ADAMS, D. H., L. WANG, ET AL. (1989). "Hepatic endothelial cells. Targets in liver allograft rejection?" *Transplantation* **47(3)**: 479-82.
- AKALIN, E., A. CHANDRAKER, ET AL. (1996). "CD28-B7 T cell costimulatory blockade by CTLA4Ig in the rat renal allograft model: inhibition of cell-mediated and humoral immune responses in vivo." *Transplantation* **62(12)**: 1942-5.
- AKBAR, A. N., L. TERRY, ET AL. (1988). "Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells." *J Immunol* **140(7)**: 2171-8.
- ANONYMOUS (1994). "A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group." *N Engl J Med* **331(17)**: 1110-5.
- ANONYMOUS (1994). "Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group." *Lancet* **344(8920)**: 423-8.
- AROEIRA, L. S., F. CARDILLO, ET AL. (1995). "Anti-IL-10 treatment does not block either the induction or the maintenance of orally induced tolerance to OVA." *Scand J Immunol* **41(4)**: 319-23.
- AUSTRUP, F., D. VESTWEBER, ET AL. (1997). "P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues." *Nature* **385(6611)**: 81-3.
- AZUMA, H., A. CHANDRAKER, ET AL. (1996). "Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93(22)**: 12439-44.

- AZUMA, M., D. ITO, ET AL. (1993). "B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28." *Nature* **366**(6450): 76-9.
- BEVERLEY, P. C. (1990). "Is T-cell memory maintained by crossreactive stimulation?" *Immunol Today* **11**(6): 203-5.
- BILLINGHAM, R. E. (1967). "The biology of graft-versus-host reactions." *Harvey Lect* **67**: 6221-78.
- BILLINGHAM, R. E., L. BRENT, ET AL. (1953). "'Active acquired tolerance" of foreign cells." *Nature* **172**: 603-606.
- BILLINGHAM, R. E., L. BRENT, ET AL. (1956). "Quantitative studies on tissue transplantation immunity. II. Actively acquired tolerance." *Phil Trans Roy Soc (London)* **B 239**: 357-414.
- BLUMBERG, D. (1987). "Creating a Ribonuclease-free environment." *Methods in Enzymology* **152**: 20-22.
- BOISE, L. H., A. J. MINN, ET AL. (1995). "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." *Immunity* **3**(1): 87-98.
- BOLTON, E. M., J. A. GRACIE, ET AL. (1989). "Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat." *J Exp Med* **169**(6): 1931-46.
- BOREL, J. F., C. FEURER, ET AL. (1976). "Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent." *Agents Actions* **43**(3-4): 179-86.
- BORRIELLO, F., M. P. SETHNA, ET AL. (1997). "B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation." *Immunity* **6**(3): 303-13.
- BOUSSIOTIS, V. A., G. J. FREEMAN, ET AL. (1993). "B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance." *J Exp Med* **178**(5): 1753-63.
- BRENNAN, D. C., T. MOHANAKUMAR, ET AL. (1995). "Donor-specific transfusion and donor bone marrow infusion in renal transplantation tolerance: a review of efficacy and mechanisms." *Am J Kidney Dis* **26**(5): 701-15.

- BRIGGS, J. D. (1991). "A critical review of immunosuppressive therapy." *Immunol Lett* **29(1-2)**: 89-94.
- BRUNNER, T., R. J. MOGIL, ET AL. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." *Nature* **373(6513)**: 441-4.
- BUELENS, C., F. WILLEMS, ET AL. (1995). "Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells." *Eur J Immunol* **25(9)**: 2668-72.
- BUER, J., A. LANOUE, ET AL. (1998). "Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo." *J Exp Med* **187(2)**: 177-83.
- BUGEON, L., M. C. CUTURI, ET AL. (1992). "Peripheral tolerance of an allograft in adult rats--characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft." *Transplantation* **54(2)**: 219-25.
- BUMGARDNER, G. L., T. BILLIAR, ET AL. (1989). "In vitro immunosuppressive effects of murine hepatocyte cytosol." *Transplant Proc* **21(1 Pt 1)**: 1154-5.
- BURDICK, J. F. AND L. W. CLOW (1990). "Rejection of primarily vascularized heart grafts. III. Depression of the interleukin 2 mechanism early after grafting." *Transplantation* **50(3)**: 476-81.
- BUTCHER, G. W., J. R. CORVALAN, ET AL. (1982). "Immune response genes controlling responsiveness to major transplantation antigens. Specific major histocompatibility complex-linked defect for antibody responses to class I alloantigens." *J Exp Med* **155(1)**: 303-20.
- CALLERY, M. P., T. KAMEI, ET AL. (1990). "The anatomic site-specificity of tolerance induction to alloantigen." *Transplantation* **49(1)**: 230-3.
- CALNE, R. Y. (1960). "The inhibition of homograft rejection in dogs by 6-mercaptopurine." *Lancet* **227(261)**: 903-6.

- CALNE, R. Y. (1977). "The present status of liver transplantation." *Transplant Proc* **9(1)**: 209-16.
- CALNE, R. Y., K. ROLLES, ET AL. (1979). "Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers." *Lancet* **2(8151)**: 1033-6.
- CALNE, R. Y., R. A. SELLS, ET AL. (1969). "Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts." *Nature* **223(205)**: 472-6.
- CALNE, R. Y., H. F. O. WHITE, ET AL. (1967). "Observations of orthotopic liver transplantation in the pig." *Brit Med J* **2**: 478.
- CALNE, R. Y., H. F. O. WHITE, ET AL. (1967). "Prolonged survival of liver transplants in the pig." *Brit Med J* **4**: 645-648.
- CHANG, G. J., H. D. MAHANTY, ET AL. (2000). "Experience with the use of sirolimus in liver transplantation--use in patients for whom calcineurin inhibitors are contraindicated." *Liver Transpl* **6(6)**: 734-40.
- CIUBOTARIU, R., R. VASILESCU, ET AL. (2001). "Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts." *Hum Immunol* **62(1)**: 15-20.
- COBBOLD, S. AND H. WALDMANN (1998). "Infectious tolerance." *Curr Opin Immunol* **10(5)**: 518-24.
- DAI, Z., B. T. KONIECZNY, ET AL. (1998). "Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice." *J Immunol* **161(4)**: 1659-63.
- DALLMAN, M. J. (1995). "Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult." *Curr Opin Immunol* **7(5)**: 632-8.
- DALLMAN, M. J., O. SHIHO, ET AL. (1991). "Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway." *J Exp Med* **173(1)**: 79-87.
- DAUSSET, J. (1958). "Iso-leuco-anticorps." *Acta Haemat* **20(1)**: 156-166.

- DAVIES, H. S., S. G. POLLARD, ET AL. (1989). "Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients." *Transplantation* **47(3)**: 524-7.
- DAVIS, M. M., J. J. BONIFACE, ET AL. (1998). "Ligand recognition by alpha beta T cell receptors." *Annu Rev Immunol* **14(1996)**.
- DEL-PRETE, G., M. DE-CARLI, ET AL. (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." *J Immunol* **150(2)**: 353-60.
- DEMETRIS, A., D. ADAMS, ET AL. (1996). "Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel." *Hepatology* **31(3)**: 792-9.
- DESILVA, D. R., K. B. URDAHL, ET AL. (1991). "Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation." *J Immunol* **147(10)**: 3261-7.
- DHEIN, J., H. WALCZAK, ET AL. (1995). "Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)." *Nature* **373(6513)**: 438-41.
- DING, L., P. S. LINSLEY, ET AL. (1993). "IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression." *J Immunol* **151(3)**: 1224-34.
- EGAWA, H., O. M. MARTINEZ, ET AL. (1995). "Acute liver allograft rejection in the rat. An analysis of the immune response." *Transplantation* **59(1)**: 97-102.
- EGAWA, H., O. M. MARTINEZ, ET AL. (1995). "Long-term nonresponsiveness to a liver allograft may be cytokine mediated." *Transplant Proc* **27(1)**: 241-2.
- ENGEMANN, R., H. J. GASSEL, ET AL. (1989). "The influence of MHC subregions on the induction of suppressor cells after orthotopic rat liver transplantation." *Transplant Proc* **21(1 Pt 1)**: 427-8.
- FARGES, O., P. J. MORRIS, ET AL. (1994). "Spontaneous acceptance of liver allografts in the rat. Analysis of the immune response." *Transplantation* **57(2)**: 171-7.

- FARGES, O., P. J. MORRIS, ET AL. (1995). "Spontaneous acceptance of rat liver allografts is associated with an early downregulation of intragraft interleukin-4 messenger RNA expression." *Hepatology* **21(3)**: 767-75.
- FERGUSON, T. A. AND D. R. GREEN (1999). "T cells are just dying to accept grafts." *Nat Med* **5(11)**: 1231-1232.
- FOY, T. M., A. ARUFFO, ET AL. (1996). "Immune regulation by CD40 and its ligand GP39." *Annu Rev Immunol* **14(1996)**.
- FRASER, J. D., B. A. IRVING, ET AL. (1991). "Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28." *Science* **251(4991)**: 313-6.
- FREEMAN, G. J., A. S. FREEDMAN, ET AL. (1989). "B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells." *J Immunol* **143(8)**: 2714-22.
- GAO, Y., J. M. HERNDON, ET AL. (1998). "Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis." *J Exp Med* **188(5)**: 887-96.
- GARNIER, H., J. P. CLOT, ET AL. (1965). "Liver transplantation in the pig: surgical approach." *Seances Acad Sci (Paris)* **260**: 5621-5623.
- GARSIDE, P., M. STEEL, ET AL. (1995). "T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction." *J Immunol* **154(11)**: 5649-55.
- GASSEL, H. J., I. V. HUTCHINSON, ET AL. (1992). "The role of T suppressor cells in the maintenance of spontaneously accepted orthotopic rat liver allografts." *Transplantation* **54(6)**: 1048-53.
- GASSEL, H. J., I. V. HUTCHINSON, ET AL. (1989). "Phenotypic characterization of T-suppressor lymphocytes induced by orthotopic rat liver transplantation." *Transplant Proc* **21(1 Pt 1)**: 429-30.
- GIMMI, C. D., G. J. FREEMAN, ET AL. (1991). "B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88(15)**: 6575-9.

- GRAZIADEI, I. W., R. H. WIESNER, ET AL. (1999). "Long-term results of patients undergoing liver transplantation for primary sclerosing cholangitis." *Hepatology* **30(5)**: 1121-7.
- GROUX, H., A. O'GARRA, ET AL. (1997). "A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389(6652)**: 737-42.
- GUINAN, E. C., V. A. BOUSSIOTIS, ET AL. (1999). "Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts." *N Engl J Med* **340(22)**: 1704-14.
- GUINAN, E. C., J. G. GRIBBEN, ET AL. (1994). "Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity." *Blood* **84(10)**: 3261-82.
- GUNTHER, E. (1996). "Current status of the molecular genetic analysis of the rat major histocompatibility complex." *Folia Biol* **42(4)**: 129-45.
- HALLORAN, P. F., A. P. BROSKI, ET AL. (1993). "The molecular immunology of acute rejection: an overview." *Transpl Immunol* **1(1)**: 3-27.
- HARDING, F. A., J. G. MCARTHUR, ET AL. (1992). "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." *Nature* **356(6370)**: 607-9.
- HASSAN, A. T., Z. DAI, ET AL. (1999). "Regulation of alloantigen-mediated T-cell proliferation by endogenous interferon-gamma: implications for long-term allograft acceptance." *Transplantation* **68(1)**: 124-9.
- HATHCOCK, K. S., G. LASZLO, ET AL. (1993). "Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation." *Science* **262(5135)**: 905-7.
- HEDRICH, H. J. (1991). "List of mutant genes and polymorphic loci in the rat (*Rattus norvegicus*)." *Rat Newsletter* **25**: 4-19.
- HOCKENBERY, D., G. NUNEZ, ET AL. (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." *Nature* **348(6299)**: 334-6.
- HOLLANDER, G. A., E. CASTIGLI, ET AL. (1996). "Induction of alloantigen-specific tolerance by B cells from CD40-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93(10)**: 4994-8.

- HOLLANDER, G. A., S. ZUKLYS, ET AL. (1999). "On costimulatory signals and T cell tolerance: relevance for transplantation immunity." *Transplant Proc* **31(1-2a)**.
- INABA, K., M. WITMER-PACK, ET AL. (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." *J Exp Med* **180(5)**: 1849-60.
- ISHIKURA, H., S. TSUCHIMOTO, ET AL. (1987). "Leukocyte subsets infiltrating into fully allogeneic, long-surviving rat liver allografts." *Transplantation* **43(5)**: 709-14.
- ISOBE, M., H. YAGITA, ET AL. (1992). "Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1." *Science* **255(5048)**: 1125-7.
- IWAKOSHI, N. N., J. P. MORDES, ET AL. (2000). "Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner." *J Immunol* **164(1)**: 512-21.
- JAIN, J., C. LOH, ET AL. (1995). "Transcriptional regulation of the IL-2 gene." *Curr Opin Immunol* **7(3)**: 333-42.
- JAISWAL, A. I., C. DUBEY, ET AL. (1996). "Regulation of CD40 ligand expression on naive CD4 T cells: a role for TCR but not co-stimulatory signals." *Int Immunol* **8(2)**: 275-85.
- JENKINS, M. K. AND R. H. SCHWARTZ (1987). "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo." *J Exp Med* **165(2)**: 302-19.
- JENKINS, M. K., P. S. TAYLOR, ET AL. (1991). "CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells." *J Immunol* **147(8)**: 2461-6.
- JONSSON, J. R., P. G. HOGAN, ET AL. (1997). "Peripheral blood chimerism following human liver transplantation." *Hepatology* **25(5)**: 1233-6.
- KAMADA, N. AND R. Y. CALNE (1983). "A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat." *Surgery* **93(1 Pt 1)**: 64-9.

- KAMADA, N., R. SUMIMOTO, ET AL. (1988). "Mechanisms of transplantation tolerance induced by liver grafting in rats: involvement of serum factors in clonal deletion." *Immunology* **64(2)**: 315-7.
- KAMADA, N., K. TERAMOTO, ET AL. (1988). "Cellular basis of transplantation tolerance induced by liver grafting in the rat. Extent of clonal deletion among thoracic duct lymphocytes, spleen, and lymph node cells." *Transplantation* **46(1)**: 165-7.
- KAMADA, N. AND D. G. WIGHT (1984). "Antigen-specific immunosuppression induced by liver transplantation in the rat." *Transplantation* **38(3)**: 217-21.
- KAMEI, T., M. P. CALLERY, ET AL. (1990). "Kupffer cell blockade prevents induction of portal venous tolerance in rat cardiac allograft transplantation." *J Surg Res* **48(5)**: 393-6.
- KAMOGAWA, Y., L. A. MINASI, ET AL. (1993). "The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells." *Cell* **75(5)**: 985-95.
- KAPPLER, J. W., N. ROEHM, ET AL. (1987). "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." *Cell* **49(2)**: 273-80.
- KAWAI, K. AND P. S. OHASHI (1995). "Immunological function of a defined T-cell population tolerized to low-affinity self antigens." *Nature* **374(6517)**: 68-9.
- KENYON, N. S., M. CHATZIPETROU, ET AL. (1999). "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96(14)**: 8132-7.
- KENYON, N. S., L. A. FERNANDEZ, ET AL. (1999). "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD154." *Diabetes* **48(7)**: 1473-81.
- KIRK, A. D., L. C. BURKLY, ET AL. (1999). "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates." *Nat Med* **5(6)**: 686-93.
- KIRK, A. D., D. M. HARLAN, ET AL. (1997). "CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94(16)**: 8789-94.

- KNECHTLE, S. J., J. A. WOLFE, ET AL. (1987). "Infiltrating cell phenotypes and patterns associated with hepatic allograft rejection or acceptance." *Transplantation* **43(2)**: 169-72.
- KNOOP, M., U. NEUMANN, ET AL. (1995). "Immunologische Toleranz nach experimenteller Lebertransplantation. [Immunologic tolerance after experimental liver transplantation]." *Langenbecks Arch Chir* **380(5)**: 281-7.
- KO, S., A. DEIWICK, ET AL. (1999). "The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat." *Nat Med* **5(11)**: 1292-7.
- KONIECZNY, B. T., Z. DAI, ET AL. (1998). "IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways." *J Immunol* **160(5)**: 2059-64.
- KRUMMEL, M. F. AND J. P. ALLISON (1996). "CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells." *J Exp Med* **183(6)**: 2533-40.
- LANGREHR, J. M., M. GLANEMANN, ET AL. (1998). "A randomized, placebo-controlled trial with anti-interleukin-2 receptor antibody for immunosuppressive induction therapy after liver transplantation." *Clin Transplant* **12(4)**: 303-12.
- LARSEN, C. P., S. C. RITCHIE, ET AL. (1994). "Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells." *J Immunol* **152(11)**: 5208-19.
- LECHLER, R. AND J. A. BLUESTONE (1997). "Transplantation tolerance--putting the pieces together." *Curr Opin Immunol* **9(5)**: 631-3.
- LEDERBERG, S. (1959). "Genes and antibodies." *Science* **129**: 1649-1653.
- LEDERER, J. A., J. S. LIOU, ET AL. (1996). "Regulation of NF-kappa B activation in T helper 1 and T helper 2 cells." *J Immunol* **156(1)**: 56-63.
- LEE, K. M., E. CHUANG, ET AL. (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." *Science* **282(5397)**: 2263-6.

- LEE, S., A. C. CHARTERS, ET AL. (1973). "A technique for orthotopic liver transplantation in the rat." *Transplantation* **16(6)**: 664-9.
- LENSCHOW, D. J., T. L. WALUNAS, ET AL. (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." *Annu Rev Immunol* **14(1996)**.
- LENSCHOW, D. J., Y. ZENG, ET AL. (1992). "Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig." *Science* **257(5071)**: 789-92.
- LERUT, J., R. D. GORDON, ET AL. (1987). "Surgical complications in human orthotopic liver transplantation." *Acta Chir Belg* **87(3)**: 193-204.
- LERUT, J., R. D. GORDON, ET AL. (1987). "Surgical complications in human orthotopic liver transplantation
Biliary tract complications in human orthotopic liver transplantation." *Acta Chir Belg* **87(3)**: 193-204.
- LETTERIO, J. J. AND A. B. ROBERTS (1998). "Regulation of immune responses by TGF-beta." *Annu Rev Immunol* **16**: 137-61.
- LEVISETTI, M. G., P. A. PADRID, ET AL. (1997). "Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation." *J Immunol* **159(11)**: 5187-91.
- LI, X. C., P. ROY-CHAUDHURY, ET AL. (1998). "IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection." *J Immunol* **161(2)**: 890-6.
- LI, Y., X. C. LI, ET AL. (1999). "Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance." *Nat Med* **5(11)**: 1298-302.
- LIN, H., S. F. BOLLING, ET AL. (1993). "Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion." *J Exp Med* **178(5)**: 1801-6.
- LINDSTEN, T., C. H. JUNE, ET AL. (1989). "Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway." *Science* **244**: 339-343.

- LINSLEY, P. S., W. BRADY, ET AL. (1991). "CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7." *J Exp Med* **174(3)**: 561-9.
- LINSLEY, P. S., E. A. CLARK, ET AL. (1990). "T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87(13)**: 5031-5.
- LIU, M. F., J. S. LI, ET AL. (1999). "Differential expression and modulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus." *Scand J Immunol* **49(1)**: 82-7.
- MAIER, C. C. AND M. I. GREENE (1998). "Biochemical features of anergic T cells." *Immunol Res* **17(1-2)**: 133-40.
- MANDELBROT, D. A., Y. FURUKAWA, ET AL. (1999). "Expression of B7 molecules in recipient, not donor, mice determines the survival of cardiac allografts." *J Immunol* **163(7)**: 3753-7.
- MARRACK, P. AND J. KAPPLER (1987). "The T cell receptor." *Science* **238(4830)**: 1073-9.
- MARTINEZ, O. M., R. S. GIBBONS, ET AL. (1990). "IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells." *J Immunol* **144(6)**: 2211-5.
- MAZARIEGOS, G. V., J. REYES, ET AL. (1997). "Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients." *Transplantation* **63(2)**: 243-9.
- MILLER, J. F. AND G. MORAHAN (1992). "Peripheral T cell tolerance." *Annu Rev Immunol* **10**: 51-69.
- MINTY, A., P. CHALON, ET AL. (1993). "Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses." *Nature* **362(6417)**: 248-50.
- MIYANARI, N., Y. YAMAGUCHI, ET AL. (1997). "Persistent infiltration of CD45RC-CD4+ T cells, Th2-like effector cells, in prolonging hepatic allografts in rats pretreated with a donor-specific blood transfusion." *Hepatology* **25(4)**: 1008-13.
- MONACO, A. P. (1999). "Antilymphocyte serum, donor bone marrow and tolerance to allografts: the journey is the reward." *Transplant Proc* **31(1-2)**: 67-71.

- MOSKOPHIDIS, D., F. LECHNER, ET AL. (1993). "Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells." *Nature* **362(6422)**: 758-61.
- MOSMANN, T. R., H. CHERWINSKI, ET AL. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136(7)**: 2348-57.
- MURASE, N., T. E. STARZL, ET AL. (1995). "Variable chimerism, graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to brown Norway rats." *Transplantation* **60(2)**: 158-71.
- NAGATA, S. (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell* **88(3)**: 355-65.
- NAGATA, S. AND T. SUDA (1995). "Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations." *Immunol Today* **16(1)**: 39-43.
- NAKAGAWA, K., T. MATSUNO, ET AL. (2001). "Donor dendritic cells and recipient Kupffer cells in the induction of donor-specific immune hyporesponsiveness." *J Int Med Res* **29(2)**: 119-30.
- NATL-INST-HEALTH-CONSENS-DEV-CONF (1983). "Liver transplantation. National Institutes of Health Consensus Development." *Hepatology* **4(7)**: 107s-110s.
- NEUHAUS, P., G. BLUMHARDT, ET AL. (1995). "Comparison of FK506- and cyclosporine-based immunosuppression in primary orthotopic liver transplantation. A single center experience." *Transplantation* **59(1)**: 31-40.
- NOSSAL, G. J. (1994). "Negative selection of lymphocytes." *Cell* **76(2)**: 229-39.
- OHASHI, P. S., S. OEHEN, ET AL. (1991). "Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice." *Cell* **65(2)**: 305-17.
- OSMOND, D. G. (1993). "The turnover of B-cell populations." *Immunol Today* **14(1)**: 34-7.
- OSSEVOORT, M. A., J. RINGERS, ET AL. (1999). "Prevention of renal allograft rejection in primates by blocking the B7/CD28 pathway." *Transplantation* **68(7)**: 1010-8.

- OWEN, R. D., H. P. DAVIS, ET AL. (1946). "Quintuplet calves and erythrocyte mosaicism." *J Hered* **37**: 291-297.
- PATTISON, J. M. AND A. M. KRENSKY (1997). "New insights into mechanisms of allograft rejection." *Am J Med Sci* **313(5)**: 257-63.
- PAWELEC, G. (1993). "Suppressor cells in transplantation immunology: do recent advances in T cell immunobiology and cytokine networking contribute to the solution of an old conundrum?" *Transpl Immunol* **1(3)**: 172-81.
- PLAIN, K. M., L. FAVA, ET AL. (1997). "Induction of tolerance with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibodies is associated with down-regulation of TH2 cytokines." *Transplantation* **64(11)**: 1559-67.
- POLLARD, S. G., H. F. DAVIES, ET AL. (1990). "Peroperative appearance of serum class I antigen during liver transplantation." *Transplantation* **49(3)**: 659-60.
- RADVANYI, L. G., A. BANERJEE, ET AL. (1999). "Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells." *Scand J Immunol* **50(5)**: 499-509.
- REED, A., J. PIRSCH, ET AL. (1991). "Multivariate analysis of donor-specific versus random transfusion protocols in haploidentical living-related transplants." *Transplantation* **51(2)**: 382-4.
- RICORDI, C., T. KARATZAS, ET AL. (1997). "Effect of timing of donor bone marrow infusions on liver allograft survival." *Transplant Proc* **29(1-2)**.
- RICORDI, C., T. KARATZAS, ET AL. (1997). "High-dose donor bone marrow infusions to enhance allograft survival: the effect of timing." *Transplantation* **63(1)**: 7-11.
- ROBERTS, J. L., S. O. SHARROW, ET AL. (1990). "Clonal deletion and clonal anergy in the thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities." *J Exp Med* **171(3)**: 935-40.
- ROCHA, B., A. GRANDIEN, ET AL. (1995). "Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance." *J Exp Med* **181(3)**: 993-1003.

- ROCKEN, M., J. H. SAURAT, ET AL. (1992). "A common precursor for CD4+ T cells producing IL-2 or IL-4." *J Immunol* **148(4)**: 1031-6.
- ROGERS, P. R. AND M. CROFT (2000). "CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen." *J Immunol* **164(6)**: 2955-63.
- ROTZSCHKE, O. AND K. FALK (1991). "Naturally-occurring peptide antigens derived from the MHC class-I-restricted processing pathway." *Immunol Today* **12(12)**: 447-55.
- ROY, M., A. ARUFFO, ET AL. (1995). "Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses." *Eur J Immunol* **25(2)**: 596-603.
- RUHLMANN, A. AND A. NORDHEIM (1997). "Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation." *Immunobiology* **198(1-3)**: 192-206.
- RULIFSON, I. C., A. I. SPERLING, ET AL. (1997). "CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines." *J Immunol* **158(2)**: 658-65.
- RUSSELL, M. E., W. W. HANCOCK, ET AL. (1996). "Chronic cardiac rejection in the LEW to F344 rat model. Blockade of CD28-B7 costimulation by CTLA4Ig modulates T cell and macrophage activation and attenuates arteriosclerosis." *J Clin Invest* **97(3)**: 833-8.
- SADLACK, B., H. MERZ, ET AL. (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." *Cell* **75(2)**: 253-61.
- SALOMON, B. AND J. A. BLUESTONE (1996). "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation." *Annu Rev Immunol* **19**: 225-52.
- SANSOM, D. M. AND N. D. HALL (1993). "B7/BB1, the ligand for CD28, is expressed on repeatedly activated human T cells in vitro." *Eur J Immunol* **23(1)**: 295-8.
- SASAZUKI, T., I. KIKUCHI, ET AL. (1989). "HLA-linked immune suppression in humans." *Immunol_Suppl* **2**: 21-4.

- SATO, K., K. YABUKI, ET AL. (1996). "Role of Kupffer cells in the induction of tolerance after liver transplantation." *J Surg Res* **63(2)**: 433-8.
- SAYEGH, M. H., E. AKALIN, ET AL. (1995). "CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2." *J Exp Med* **181(5)**: 1869-74.
- SAYEGH, M. H. AND L. A. TURKA (1998). "The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection." *N Engl J Med* **338(25)**: 1813-21.
- SCHLITT, H. J., G. RADDATZ, ET AL. (1993). "Passenger lymphocytes in human liver allografts and their potential role after transplantation." *Transplantation* **56(4)**: 951-5.
- SCHREIBER, S. L. AND G. R. CRABTREE (1992). "The mechanism of action of cyclosporin A and FK506." *Immunol Today* **13(4)**: 136-42.
- SCHWARTZ, R., J. STACK, ET AL. (1959). "Effect of 6-Mercaptopurine on primary and secondary immune response." *J Clin Invest* **38**: 1394-1403.
- SCHWARTZ, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." *Science* **248(4961)**: 1349-56.
- SCHWARTZ, R. H. (1997). "T cell clonal anergy." *Curr Opin Immunol* **9(3)**: 351-7.
- SCHWEITZER, A. N. AND A. H. SHARPE (1999). "Mutual regulation between B7-1 (CD80) expressed on T cells and IL-4." *J Immunol* **163(9)**: 4819-25.
- SHAW, B. W., D. J. MARTIN, ET AL. (1984). "Venous bypass in clinical liver transplantation." *Ann Surg* **200(4)**: 524-34.
- SHEINER, P. A., J. F. MAGLIOCCA, ET AL. (2000). "Long-term medical complications in patients surviving > or = 5 years after liver transplant." *Transplantation* **69(5)**: 781-9.
- SHI, Y. F., B. M. SAHAI, ET AL. (1989). "Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes." *Nature* **339(6226)**: 625-6.
- SIEGLING, A., M. LEHMANN, ET AL. (1994). "A nondepleting anti-rat CD4 monoclonal antibody that suppresses T helper 1-like but not T helper 2-like intragraft lymphokine secretion induces long-term survival of renal allografts." *Transplantation* **57(3)**: 464-7.

- SPERLING, A. I., J. A. AUGER, ET AL. (1996). "CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation." *J Immunol* **157**(9): 3909-17.
- SRIWATANAWONGSA, V., H. S. DAVIES, ET AL. (1995). "The essential roles of parenchymal tissues and passenger leukocytes in the tolerance induced by liver grafting in rats." *Nat Med* **1**(5): 428-32.
- STACK, R. M., D. J. LENSCHOW, ET AL. (1994). "IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2." *J Immunol* **152**(12): 5723-33.
- STARZL, T. E. (1989). "The present state of liver transplantation and the future prospects for intestinal transplantation." *Immunol Invest* **18**(1-4): 623-33.
- STARZL, T. E. AND A. J. DEMETRIS (1990). "Liver transplantation: a 31-year perspective. Part I." *Curr Probl Surg* **27**(2): 49-116.
- STARZL, T. E., A. J. DEMETRIS, ET AL. (1992). "Cell migration, chimerism, and graft acceptance." *Lancet* **339**(8809): 1579-82.
- STARZL, T. E., C. G. GROTH, ET AL. (1968). "Orthotopic homotransplantation of the human liver." *Ann Surg* **168**(3): 392-415.
- STARZL, T. E., S. IWATSUKI, ET AL. (1986). "Liver transplantation in the ciclosporin era." *Prog Allergy* **2**(1949).
- STARZL, T. E., T. L. MARCHIORO, ET AL. (1964). "Experimental and clinical homotransplantation of the human liver." *Ann NY Acad Sci* **120**: 739-765.
- STARZL, T. E., T. L. MARCHIORO, ET AL. (1963). "Homotransplantation of the liver in humans." *Surg-Gynecol- Obstet* **117**: 659-676.
- STEINMAN, R. M. AND M. D. WITMER (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10): 5132-6.
- STEINMULLER, D. (1967). "Immunization with skin isografts taken from tolerant mice." *Science* **158**(797): 127-9.

- STERNECK, M., L. FISCHER, ET AL. (2000). "Mycophenolate mofetil for prevention of liver allograft rejection: initial results of a controlled clinical trial." *Ann Transplant* **5(1)**: 43-6.
- STROBER, S., M. DHILLON, ET AL. (1989). "Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation." *N Engl J Med* **321(1)**: 28-33.
- SUN, J., G. W. MCCAUGHAN, ET AL. (1995). "Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation." *Transplantation* **60(3)**: 233-6.
- SUN, J., G. W. MCCAUGHAN, ET AL. (1994). "Tolerance to rat liver allografts. I. Differences between tolerance and rejection are more marked in the B cell compared with the T cell or cytokine response." *Transplantation* **57(9)**: 1349-57.
- SZOT, G. L., P. ZHOU, ET AL. (2000). "Absence of host B7 expression is sufficient for long-term murine vascularized heart allograft survival." *Transplantation* **69(5)**: 904-9.
- TAKEUCHI, T., R. P. LOWRY, ET AL. (1992). "Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance." *Transplantation* **53(6)**: 1281-94.
- TAYLOR, P. A., R. J. NOELLE, ET AL. (2001). "CD4+CD25+ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade." *J Exp Med* **193(11)**: 1311-7.
- THOMAS, J. M., F. M. CARVER, ET AL. (1991). "Kidney allograft tolerance in primates without chronic immunosuppression--the role of veto cells." *Transplantation* **51(1)**: 198-207.
- TSAROUCHA, A. K., C. RICORDI, ET AL. (1997). "Donor peripheral blood stem cell infusions in recipients of living-related liver allografts." *Transplantation* **64(2)**: 362-4.
- TU, Y., A. REHMAN, ET AL. (1997). "CTLA4-Ig treatment prolongs rat orthotopic liver graft survival." *Transplant Proc* **29(1-2)**: 1036-7.
- UNOS (1999). "Annual report of the U.S." http://www.unos.org/data/anrpt_main.htm.

- VAN-PARIJS, L., A. IBRAGHIMOV, ET AL. (1996). "The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance." *Immunity* **4(3)**: 321-8.
- WALDMANN, H. (1991). "Therapeutic approaches for transplantation." *Curr Opin Immunol* **13(5)**: 606-10.
- WALDMANN, H. AND S. COBBOLD (1998). "How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance?" *Annu Rev Immunol* **16**: 619-44.
- WALUNAS, T. L., C. Y. BAKKER, ET AL. (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." *J Exp Med* **183(6)**: 2541-50.
- WALUNAS, T. L., D. J. LENSCHOW, ET AL. (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* **1(5)**: 405-13.
- WEBB, S., C. MORRIS, ET AL. (1990). "Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity." *Cell* **63(6)**: 1249-56.
- WEINBERG, A. D., R. WHITHAM, ET AL. (1992). "Transforming growth factor-beta enhances the in vivo effector function and memory phenotype of antigen-specific T helper cells in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **148(7)**: 2109-17.
- WEISS, S. AND B. BOGEN (1991). "MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen." *Cell* **64(4)**: 767-76.
- WELLS, A. D., X. C. LI, ET AL. (1999). "Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance." *Nat Med* **5(11)**: 1303-7.
- WIESNER, R. H., K. P. BATTS, ET AL. (1999). "Evolving concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of chronic hepatic allograft rejection." *Liver Transpl Surg* **5(5)**: 388-400.
- WOLVERS, D. A., M. J. VAN-DER-CAMMEN, ET AL. (1997). "Mucosal tolerance is associated with, but independent of, up-regulation Th2 responses." *Immunology* **92(3)**: 328-33.

- YAN, Y., S. SHASTRY, ET AL. (2001). "Posttransplant administration of donor leukocytes induces long-term acceptance of kidney or liver transplants by an activation-associated immune mechanism." *J Immunol* **166(8)**: 5258-64.
- YANG, C. P. AND E. B. BELL (1992). "Functional maturation of recent thymic emigrants in the periphery: development of alloreactivity correlates with the cyclic expression of CD45RC isoforms." *Eur J Immunol* **22(9)**: 2261-9.
- YAZDANBAKHSI, K., J. W. CHOI, ET AL. (1995). "Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92(2)**: 437-41.
- YIN, D. AND C. G. FATHMAN (1995). "Induction of tolerance to heart allografts in high responder rats by combining anti-CD4 with CTLA4Ig." *J Immunol* **155(4)**: 1655-9.
- ZIMMERMANN, F. A., G. W. BUTCHER, ET AL. (1979). "Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of the immunologic responses to fully allogeneic liver grafts." *Transplant Proc* **11(1)**: 571-7.
- ZIMMERMANN, F. A., H. S. DAVIES, ET AL. (1984). "Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft." *Transplantation* **37(4)**: 406-10.

IX. Anhang**A. Abkürzungen**

APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BN	Brown Norway (Rattenstamm)
CD	cluster of differentiation
DA	Dark Agouti (Rattenstamm)
GvHD	Graft-versus-Host-Krankheit
H.E.	Hämatoxilin-Eosin Färbung
HLA	human leucocyte antigen
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-10	Interleukin-10
IL-12 β	Interleukin-12-beta
INF- γ	Interferon-gamma
i.p.	intraperitoneal
mAk	monoklonale Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NK	natürliche Killer Zellen
OLT	orthotope Lebertransplantation
ORLT	orthotope Rattenlebertransplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
POD	postoperativer Tag
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helfer

X. Danksagung

Meinem Lehrer, Prof. Dr. med P.J. Neuhaus, möchte ich für die jahrelange Ausbildung in Klinik und Wissenschaft danken. Ohne seine unermüdliche Förderung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Sein Vertrauen, mich selbstständig arbeiten zu lassen, war immer die bestmögliche Motivation.

Herrn PD Dr. med. J.M. Langrehr gebührt mein Dank für die Begleitung und Ausbildung in meiner wissenschaftlichen Arbeit seit Beginn der Promotion.

Herrn Dr. V. Schmitz sei für seine wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Experimente und der Ausarbeitung der Habilitationsschrift gedankt.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich danken für den stetigen außergewöhnlichen Einsatz, die Loyalität und den freundschaftlichen Umgang. Erwähnt sei hier Herr Dietrich Polenz, der seit Beginn meiner experimentellen Arbeit für die Verbesserung der Arbeitsbedingungen sorgte.

Herrn Steffen Lippert, Frau Anja Schirmeier, Frau Daniela Roosterman und Frau Sabine Boas-Knoop möchte ich für das große Engagement bei der Tätigkeit im Labor danken.

Frau P. Peix möchte ich für die Hilfestellung bei der Entstehung der Arbeit danken.

Herrn PD Dr. med. M. Knoop sei für die Einführung in die experimentelle Lebertransplantation in der Ratte gedankt. Herrn PD Dr. med. H. Al-Abadi möchte ich für die Hilfe bei der Auswertung der Versuche danken.

Meinen Kollegen, Dr. med. D. Seehofer, Dr. med. T. Theruvath und Dr. med. B. Stange, sei für ihre Unterstützung durch die Übernahme klinischer Tätigkeiten während der Entstehung dieser Arbeit gedankt.

Meiner Frau und Kollegin, Frau Dr. med. M. Lang, danke ich für die unermüdliche Hilfe bei der Erstellung der Habilitationsschrift.